

DISERTASI

EKSPRESI *miRNA-99b-5p* DAN *miRNA-29a-3p* SEBAGAI BIOMARKER SERTA KORELASINYA DENGAN KADAR *TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA (TNF- α)* DAN *INTERFERON-GAMMA (IFN- γ)* PADA PENDERITA TUBERKULOSIS PARU AKTIF DAN TUBERKULOSIS LATEN

EXPRESSION OF miRNA-99b-5p AND miRNA-29a-3p AS BIOMARKERS AND THEIR CORRELATION WITH TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA (TNF- α) AND INTERFERON-GAMMA (IFN- γ) LEVELS IN ACTIVE PULMONARY TUBERCULOSIS AND LATENT TUBERCULOSIS



NIRMAWATI ANGRIA

C013191007

PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2023

**EKSPRESI *miRNA-99b-5p* DAN *miRNA-29a-3p* SEBAGAI
BIOMARKER SERTA KORELASINYA DENGAN KADAR *TUMOR
NECROSIS FACTOR-ALPHA* (TNF- α) DAN *INTERFERON GAMMA*
(IFN- γ) PADA PENDERITA TUBERKULOSIS PARU AKTIF
DAN TUBERKULOSIS LATEN**

Disertasi
Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Doktor

Program Studi
S3 Ilmu Kedokteran

Disusun dan diajukan oleh

NIRMAWATI ANGRIA
C013191007

Kepada

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

DISERTASI

**EKSPRESI *miRNA-99b-5p* DAN *miRNA-29a-3p* SEBAGAI BIOMARKER
SERTA KORELASINYA DENGAN KADAR TUMOR NECROSIS FACTOR-
ALPHA (TNF- α) DAN INTERFERON-GAMMA (IFN- γ) PADA PENDERITA
TUBERKULOSIS PARU AKTIF DAN TUBERKULOSIS LATEN**

**EXPRESSION OF *miRNA-99b-5p* AND *miRNA-29a-3p* AS BIOMARKERS
AND THEIR CORRELATION WITH TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA
(TNF- α) AND INTERFERON GAMMA (IFN- γ) LEVELS IN ACTIVE
PULMONARY TUBERCULOSIS AND LATENT TUBERCULOSIS**

Disusun dan diajukan
Oleh

Nirmawati Angria
C013191007

*Telah dipertahankan di hadapan Penilai Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin
pada tanggal, 27 Januari 2023
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan*

Menyetujui
Promotor



Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, Ph.D, Sp.MK
Nip. 19670910 199603 1 001

Co. Promotor



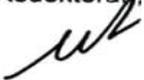
dr. Agussalim Bukhan, M.Med, Ph.D, Sp.GK(K)
Nip. 19700821 199903 1 001

Co. Promotor



Dr. dr. Irawaty Diharuddin, Sp.P(K)
Nip. 19680910 199703 1 001

Ketua Program Studi S3
Ilmu Kedokteran,



Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes
Nip. 19671103 199802 1 001

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin,



Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid, M.Kes, Sp.PD-KGH, FINASIM Sp.GK
Nip. 19680530 199603 2 001



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Makassar 90245 Telp.(0411)586010,(0411)586297
EMAIL : s3kedokteranunhas@gmail.com

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Nirmawati Angria
NIM : C013191007
Program Studi : Doktr Ilmu Kedokteran
Jenjang : S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul :

'EKSPRESI *miRNA-99b-5p* DAN *miRNA-29a-3p* SEBAGAI BIOMARKER SERTA KORELASINYA DENGAN KADAR TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF- α) DAN INTERFERON GAMMA (IFN- γ) PADA PENDERITA TUBERKULOSIS PARU AKTIF DAN TUBERKULOSIS LATEN'

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain, bahwa Disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan Disertasi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 12 Januari 2023

Yang menyatakan,



Nirmawati Angria

PRAKATA

Assalamualaikum warahmatullahi wabarakatuh. Alhamdulillah, segala puji serta syukur atas kehadiran Allah SWT atas segala rahmat, taufik dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat merampungkan disertasi dengan judul “Ekspresi *miRNA-99b-5p* dan *miRNA-3p-29a* sebagai Biomarker serta Korelasinya dengan Kadar TNF- α DAN IFN- γ pada Penderita Tuberkulosis Aktif dan Tuberkulosis Laten”. Disertasi ini disusun sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Doktor pada Program Studi S3 Ilmu Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan disertasi ini masih terdapat kelemahan yang perlu diperkuat dan kekurangan yang perlu dilengkapi. Karena itu, dengan rendah hati penulis mengaharapkan masukan, koreksi dan saran untuk memperbaiki dan melengkapi kekurangan tersebut.

Dengan tersusunnya disertasi ini, penulis mengucapkan terimakasih kepada **Direktorat Jenderal Sumber Daya Ilmu Pengetahuan, Teknologi dan Pendidikan Tinggi, Kementerian Riset dan Pendidikan Tinggi** yang telah menerima penulis untuk mengikuti program Beasiswa Pendidikan Pascasarjana Dalam Negeri (BPPDN). Penulis mengucapkan terimakasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada **Prof. dr. Muhammad Nasrum Massi, Ph.D, Sp.MK** selaku Ketua Tim Promotor, yang telah bersedia menerima penulis sebagai mahasiswa bimbingan pada

Prodi S3 Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, memberikan ilmu, inspirasi dan motivasi serta senantiasa meluangkan waktu dan kesempatannya untuk membimbing selama masa studi terutama saat riset dan penyelesaian disertasi ini. Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada **dr.Agussalim Bukhari, M.Med,Ph.D, Sp.GK(K)** dan **Dr. dr. Irawaty Djaharuddin, Sp.P(K)** selaku ko-promotor, yang berkenan memberi ilmu, arahan dan masukan serta meluangkan waktunya untuk membimbing selama masa studi penulis dan penyelesaian disertasi ini.

Penulis juga mengucapkan terima kasih dan penghargaan kepada:

1. **Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc.** selaku Rektor Universitas Hasanuddin;
2. **Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed** selaku Direktur Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin;
3. **Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid, Sp.PD.,Sp.GK** selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin;
4. **dr. Irfan Idris, M.Kes.,Ph.D** selaku Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin;
5. Seluruh Tim penguji: **Prof. Oslan Jumadi, Ph.D, S.Si.,M.Phil; Prof. Ahyar Ahmad, Ph.D; dr.Rusdina Bte Ladju, Ph.D; dr.Arif Santoso, Ph.D, Sp.P (K); dr.Upik A.Miskad, Ph.D, Sp.PA(K) dan Dr.dr.Burhanuddin Bahar, MS** atas waktu dan kesempatannya dalam menguji serta bimbingan dan masukannya agar disertasi ini menjadi baik.

6. Ibu **Hj. Suryani, SH.,MH** selaku Ketua Yayasan Pendidikan Islam Megarezky, Bapak **Dr. H. Alimuddin, SH.,MH.,MKn** selaku Ketua BPH YPI Megarezky, Bapak **Prof. Dr. dr. Ali Aspar Mappahya, Sp.PD.,Sp.JP(K)** selaku Rektor Universitas Megarezky, Ibu **Prof. Dr. Dra. Apt. Hj. Asnah Marzuki, M.Si** selaku Dekan Fakultas Teknologi Kesehatan atas dukungannya baik secara moril dan materiel kepada penulis.
7. **dr. Aswan.,M.Kes**, selaku Kepala Balai Besar Kesehatan Paru Masyarakat (BBKPM) Makassar telah menerima penulis untuk melakukan penelitian di BBKPM Makassar. Terima kasih juga untuk seluruh staf laboratorium, terutama **Bapak Kusnadi, M.Kes, Ibu Lenny, Amd.AK** yang membantu selama kegiatan penelitian terutama pada proses pengambilan data saat *sampling*.
8. Staf Laboratorium HUM-RC Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, **Ibu Handayani Halik, S.Si, M.Kes, Yusuf, S.Si, Yuliana Sari, S.Si**, atas bantuannya selama penulis melakukan penelitian.
9. Staf Prodi S3 Ilmu Kedokteran Universitas Hasanuddin (**Bapak Akmal, S.Sos, MAP, Bapak Abdul Muin Amd.FT dan Bapak Rahmat**) atas bantuannya selama penulis menjalani masa studi.
10. Teman-teman dosen dan staf kependidikan di Universitas Megarezky khususnya pada Prodi D-IV Teknologi Laboratorium Medis Fakultas Teknologi Kesehatan Universitas Megarezky.

11. Semua teman-teman seperjuangan terutama Angkatan 2019 di program studi S3 Ilmu Kedokteran, yang selalu memberikan motivasi, dorongan, dan informasi-informasi kepada peneliti sehingga peneliti dimudahkan selama masa studi.
12. Semua pihak yang telah membantu kegiatan penelitian, atas perhatian, perkenaan dan bantuan yang telah diberikan hingga tersusunnya disertasi ini. Penulis juga menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya untuk seluruh partisipan penelitian, yaitu kepada subjek penelitian yang telah berkenan untuk berpartisipasi dalam penelitian ini.

Terimakasih terkhusus untuk yang terkasih dan tersayang kedua orang tua penulis yang cintai, **Ibunda Hj. Sitti Nurhayati, S.Pd.,M.Pd dan Ayahanda Mappe Kanjo, S.Sos** atas segala curahan kasih sayangnya yang tak terbatas kepada penulis sehingga penulis bisa sampai di titik ini. Penulis mengucapkan terima kasih untuk bimbingan, inspirasi, motivasi, dukungan baik secara moril dan materiel dan doa yang tidak pernah putus senantiasa dipanjatkan kepada Allah SWT. Terima kasih juga untuk adik-adik penulis **Rachmat Attaofiq, S.Pd** dan **Serda Nur Agung** atas bantuan dan dukungannya selama penulis menjalani studi.

Untuk Suamiku tercinta, **Bripka Khaedir Ali, SH.,MH**, terimakasih atas cinta, kasih sayang, perhatian, motivasi dan doanya untuk penulis. Juga kepada putra tercinta, **Aldebaran Raiq Muwaffaq** sumber kebahagiaan

serta menjadi penyemangat jiwa penulis untuk menyelesaikan studi dengan baik dan sungguh-sungguh.

Kedua orang tua (dari suami penulis), **ibunda Hj.Haminang dan ayahanda Busran** atas doa yang senantiasa tercurahkan kepada penulis terutama selama masa studi.

Dengan memperhatikan dan mengikuti bimbingan, arahan dan perbaikan dari tim promotor dan penguji, penulis berharap disertasi ini dapat bermanfaat bagi semua yang pembacanya.

Makassar, Desember 2022

Nirmawati Angria

DAFTAR ISI

	halaman
HALAMAN SAMBUL	i
HALAMAN PENGANTAR	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI.....	iv
PRAKATA	v
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR SINGKATAN	xix
ABSTRAK	xxi
ABSTRACT	xxii
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	9
C. Tujuan Penelitian	10
D. Manfaat Penelitian.....	11
E. Nilai Kebaharuan Penelitian	11
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	13
A. Beban TB Global	13
B. Tuberkulosis di Indonesia	18
C. Tinjauan Tentang Bakteri <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	21

1. Morfologi bakteri <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ...	21
2. Fisiologi Pertumbuhan	24
D. Tinjauan Umum Penyakit Tuberkulosis	26
1. Definisi Tuberkulosis	26
2. Transmisi Infeksi <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ...	27
3. Mekanisme Patogenitas Tuberkulosis Paru.....	29
4. Aspek Immunologis Tuberkulosis.....	34
5. Produksi Sitokin <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	36
6. Gejala Klinis dan Faktor Resiko	37
7. Tuberkulosis Laten	38
E. Diagnosis Tuberkulosis Paru	39
1. Pemeriksaan Mikroskopik	40
2. Pemeriksaan Metode Kultur	44
3. Tes Tuberkulin	45
4. Tes Cepat Molekuler (TCM)	47
5. Pemeriksaan Interferon-Gamma Release Assay (IGRA)	48
F. Tinjauan tentang Micro-RNA	58
1. Definisi micro-RNA	58
2. Biogenesis micro-RNA	60
3. Peran micro-RNA sebagai Regulator Gen	63
4. Peran micro-RNA pada Penyakit Tuberkulosis..	63
G. Tinjauan miRNA-99b-5p pada Tuberkulosis.....	70

H.	Tinjauan miRNA-29b-3p pada Tuberkulosis.....	71
I.	TNF- α pada Tuberkulosis.....	72
J.	IFN- γ pada Tuberkulosis.....	76
K.	Relevansi Penelitian Sebelumnya.....	85
L.	Kerangka Teori	88
M.	Kerangka Konsep	89
N.	Hipotesis Penelitian.....	89
BAB III. METODE PENELITIAN.....		91
A.	Jenis Penelitian	91
B.	Lokasi dan Waktu	91
C.	Populasi dan Sampel Penelitian	91
	1. Populasi	91
	2. Sampel Penelitian	92
D.	Kriteria Penelitian	92
	1. Kriteria Inklusi	92
	2. Kriteria Eksklusi	93
E.	Definisi Operasional variable Penelitian	94
F.	Prosedur Kerja Penelitian.....	95
	1. Langkah-Langkah Pengumpulan Sampel	95
	2. Pemeriksaan Sputum	96
	3. Dekontaminasi Sputum	96
	4. Smear dengan Pemeriksaan Ziehl Neelsen	97
	5. Kultur pada Medium Cair MGIT 960	97

6. Pemeriksaan IGRA	98
7. Ekstraksi RNA dari Sampel Darah	99
8. Amplifikasi cDNA	100
9. Pemeriksaan Ekspresi miRNA	101
10. Pemeriksaan Kadar TNF- α dan IFN- γ	103
G. Analisis Data	104
H. Kurva Receiver operating characteristics (ROC).....	105
I. Alur Penelitian	106
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	107
A. Hasil Penelitian.....	107
1. Karakteristik Sampel	107
2. Ekspresi miRNA-99b-5p pada pasien TB Aktif, TB Laten dan Sehat	109
3. Ekspresi miRNA-29a-3p pada pasien TB Aktif, TB Laten dan Sehat	111
4. Kadar TNF- α pada pasien TB Aktif, TB laten dan Sehat	114
5. Kadar IFN- γ pada pasien TB Aktif, TB Laten dan Sehat	115
6. Korelasi Ekspresi miRNA-99b-5p terhadap Kadar TNF- α	116
7. Korelasi Ekspresi miRNA-29a-3p terhadap Kadar IFN- γ	117

8. Kurva ROC miRNA-99b-5p dan miRNA-29a-3p Sebagai Biomarker Infeksi 3p pada pasien TB Aktif dan TB Laten	118
B. Pembahasan	122
BAB V. PENUTUP	152
A. Kesimpulan	152
B. Saran.....	153
DAFTAR PUSTAKA.....	154

DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel 2.1. Perbedaan ekspresi pada miRNA pada Tuberkulosis dan Potensinya sebagai Biomarker.....	66
Tabel 2.2 MiRNA dan Efek Regulasi yang terlibat pada Infeksi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	68
Tabel 2.3 Relevansi Penelitian Sebelumnya	85
Tabel.4.1 Karakteristik Subyek Penelitian pada Kelompok TB aktif, TB laten dan Sehat	108
Tabel.4.2 Tingkat ekspresi atau Kuantifikasi Relatif..... miRNA-99b-59 pada Pasien TB Aktif dan TB Laten	109
Tabel.4.3. Perbedaan Ekspresi miRNA-99b-5p pada Pasien TB Aktif, TB Laten dan Sehat.....	110
Tabel.4.4. Analisis Post-Hoc Ekspresi miRNA-99b-5p pada Kejadian TB.....	110
Tabel.4.5 Tingkat ekspresi atau Kuantifikasi Relatif..... miRNA-29a-3p pada Pasien TB Aktif dan TB Laten	111
Tabel 4.6. Perbedaan Ekspresi miRNA-29a-3p pada Pasien TB Aktif, TB Laten dan Sehat.....	112
Tabel.4.7. Analisis Post-Hoc Ekspresi miRNA-29a-3p pada Kejadian TB.....	113
Tabel 4.8. Perbedaan Kadar TNF- α pada Pasien TB Aktif, TB Laten dan Sehat.....	114
Tabel 4.9. Analisis Post-Hoc Kadar TNF- α pada Kejadian TB.....	115
Tabel 4.10. Perbedaan Kadar IFN- γ pada Kejadian TB.....	115
Tabel 4.11. Analisis Post-Hoc Kadar IFN- γ pada Kejadian TB.....	116
Tabel 4.12. Uji Korelasi Ekspresi miRNA-99b-5p dan	

Kadar TNF- α	117
Tabel 4.13. Uji Korelasi Ekspresi miRNA-29a-3p dan Kadar IFN- γ	117
Tabel 4.14. Nilai Cut-off Point Ekspresi miRNA-29a-3p dan miRNA-99b-5p pada TB aktif	119
Tabel 4.15. Nilai Cut-off Point Ekspresi miRNA-99b-5p dan miRNA-29a-3p pada TB laten.....	120
Tabel 4.16. Nilai Cut-off Point Ekspresi miRNA-99b-5p dan miRNA-29a-3p pada TB Aktif dan TB Laten	121

DAFTAR GAMBAR

	halaman
Gambar 2.1. Negara-negara dengan Beban Tinggi TB Menurut WHO Tahun 2021	16
Gambar 2.2. Sebaran Jumlah Insiden Tuberkulosis Berdasarkan Kota dan Kabupaten di Indonesia	19
Gambar 2.3. Struktur Morfologi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22
Gambar 2.4. Penyebaran droplet dari satu individu ke individu Lainnya	29
Gambar 2.5. Tuberkulosis dimulai ketika nuklei droplet mencapai Alveoli	29
Gambar 2.6. Respon Imun Adaptif pada Penyakit TB	35
Gambar 2.7. Respon Imun Alamiah Pada Penyakit TB	35
Gambar 2.8. <i>M. tuberculosis</i> pada pewarnaan ZN.....	41
Gambar 2.9. Penggunaan IGRA dalam algoritma pemeriksaan infeksi laten tuberkulosis dan terapi pencegahan tuberkulosis pada individu berisiko	50
Gambar 2.10. Interpretasi hasil IGRA dengan menggunakan QFT-Plus.....	55
Gambar 2.11. Diagram alur interpretasi hasil IGRA dengan menggunakan QFT-Plus	56
Gambar 2.12. Biogenesis microRNA	61
Gambar 2.13. Granuloma TB Paru menunjukkan bagaimana sirkulasi mikroRNA spesifik (miRNA) dapat muncul selama proses infeksi	61
Gambar 2.14. miRNA yang terlibat dalam Aktivasi Respon Imun dan Pertahanan Makrofag Selama Infeksi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	65

Gambar 2.15. Peran TNF- α dalam Respon Imun Melawan <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	75
Gambar 2.16. Efek biologik IFN- γ	83
Gambar 2.17. Kerangka Teori	88
Gambar 2.18 Kerangka Konsep	89
Gambar 3. 1. Alur Penelitian	106
Gambar 4.1 Ekspresi miRNA-99b-5p antara kelompok TB Aktif, TB Laten dan Kontrol Sehat	110
Gambar 4.2. Ekspresi miRNA-29a-3p antara kelompok TB Aktif, TB Laten dan Kontrol Sehat	113
Gambar 4.3. Kadar TNF- α antara kelompok TB Aktif, TB Laten dan Kontrol Sehat. Perbedaan Kadar TNF- α antara ketiga kelompok dianalisis menggunakan Kruskal-Wallis test	114
Gambar.4.4. Kadar IFN- γ antara kelompok TB Aktif, TB Laten dan Kontrol Sehat	116
Gambar 4.5. Kurva ROC Ekspresi miRNA-99b-5p dan miRNA-29a-3p pada TB Aktif	119
Gambar 4.6. Kurva ROC ekspresi miRNA-99b-5p dan miRNA-29a-3p pada TB laten.....	120
Gambar 4.7. Kurva ROC ekspresi miRNA-29a-3p dan miRNA-99b-5p pada TB Aktif dan TB Laten	121

DAFTAR SINGKATAN

Ago2	Argonaute
AUC	Area Under the Curve
BBKPM	Balai Besar Kesehatan Paru Masyarakat
DGCR8	George Syndrome Critical Region 8
cDNA	complementary DNA
DC	Dendritic cell
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DOTS	Directly Observed Treatment, Short-Course
HIV	Human immunodeficiency virus
HUM-RC	Hasanuddin University Medical – Research Center
IGRA	Interferon-gamma release assay
IFN- γ	Interferon gamma
IL-6	Interleukin 6
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-12	Interleukin 12
IUATLD	Internasional Union Against Tuberculosis and Lung Disease
LPS	Lipopolisakarida
MDR TB	multi-drug resistant Tuberculosis
M.tb	Mycobacterium tuberculosis
miR	micro Ribonucleic Acid
miRNA	micro Ribonucleic Acid
MIRISC	micro Ribonucleic Acid induced Silencing Complex
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MyD88	Myeloid Differentiasi 88
NF-K β	Nuclear Factor k Beta
NK	Natural Killer (cell)
OAT	Obat Antu Tuberculosis
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pri-miRNA	Primary Micro Ribonucleic Acid

Pre-miRNA	Prekursor micro Ribonucleic Acid
QFT-GIT	QFT-Gold in Tube
QFT-Plus	QuantiFERON-TB Plus
RISC	RNA induced Silencing Complex
RNA	Ribonucleic Acid
RR-TB	Resistance Rifampisin
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
SD	Standar Deviasi
SDGs	Sustainable Development Goals
SE	Standar Error
TB	Tuberkulosis
Th	T-helper (1,2,17)
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alfa
TNFRSF-4	Tumor Necrosis Factor Reseptor Superfamily-4
TST	Tuberculin Skin Test
TLR	Toll-like Receptor
3'UTR	3' Untranslated Region
XPOS5	Exportin 5
WHO	World Health Organization
ZN	Ziehl Neelsen

ABSTRAK

NIRMAWATI ANGRIA. *Ekspresi mi-RNA-99b-5p dan mi-RNA-29a-3p serta Korelasinya dengan Kadar TNF- α dan IFN- γ sebagai Biomarker Infeksi Tuberkulosis Paru Aktif dan Tuberkulosis Laten* (dibimbing oleh Muhammad Nasrum Massi, Agussalim Bukhari, dan Irawati Djaharuddin).

Penelitian ini bertujuan mengetahui ekspresi mi-RNA-99b-5p dan mi-RNA-29a-30 sebagai biomarker serta menilai korelasinya dengan kadar TNF- α dan IFN- γ pada penderita TB aktif dan TB laten. Metode Penelitian ini menggunakan desain kasus kontrol melibatkan 50 orang penderita TB aktif, 34 orang kontak serumah dengan uji IGRA positif dan 30 kontrol sehat. Ekspresi miRNA-99b-5p dan miRNA-29a-3p diperiksa menggunakan metode kuantitatif real-time PCR (q-PCR). Pemeriksaan kadar TNF- α dan IFN- γ menggunakan metode ELISA Sedangkan Analisis data dilakukan dengan menggunakan uji Anova dan uji Kruskal Wallis serta kurva ROC. Hasil penelitian menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan pada ekspresi mi-RNA-99b-5p dan mi-RNA-29a-3p antara ketiga kelompok (p -value <0.001). Analisis kurva ROC menunjukkan ekspresi mi-RNA-99b-5p pada TB aktif memiliki sensitivitas 80% dan spesifisitas 73,3% dengan *area under the curve* (AUC) 0,829 (p -value = <0.001), sedangkan kurva ROC mi-RNA-99b-5p pada TB laten dengan sensitivitas 75.8% dan spesifisitas 66.7% dengan AUC 0,742 (p -value = <0,001), sedangkan kurva ROC menunjukkan mi-RNA-29a-3p pada TB aktif memiliki sensitivitas 84% dan spesifisitas 93.3% dengan AUC 0,879 (p -value = <0,001). Kurva ROC mi-RNA-29a-3p pada TB laten memiliki sensitivitas 84,8 % dan spesifisitas 70% dengan AUC 0.808 (p -value = <0.001). Selanjutnya, secara statistik tidak ditemukan korelasi signifikan ekspresi mi-RNA-99b-5p dengan kadar pada ketiga kelompok (p -value >0,005). Begitu pula dengan ekspresi mi-RNA-29a-3p dengan kadar IFN- γ tidak ditemukan korelasi signifikan pada tiap-tiap kelompok (p -value >0,005). mi-RNA-99b-5p dan mi-R-29a-3p menunjukkan diagnostik yang baik dalam membedakan ketiga kelompok. miR-99b-5p dan miR-29a-3p yang ada dalam darah mampu membedakan TB aktif, TB laten, dan kontrol sehat serta menunjukkan bahwa mi-RNA-99b-5p dan mi-R-29a-3p merupakan biomarker yang berguna untuk diagnosis TB.

Kata kunci: mi-RNA-99b-5p, mi-RNA-29a-3p, TNF- α , IFN- γ , TB aktif, TB laten



ABSTRACT

NIRMAWATY ANGRIA. *Expression of miRNA-99b-5p and miRNA-29a-3p and Their Correlation with TNF- α and IFN- γ Levels as Biomarkers of Active Pulmonary Tuberculosis Infection and Latent Tuberculosis* (Supervised by Muhammad Nasrum Massi, Agussalim Bukhari, and Irawati Djaharuddin).

This study aims to determine the expression of miRNA-99b-5p and miRNA-29a-3p as biomarkers and to assess their correlation with TNF- α and IFN- γ levels in active and latent TB patients. This study used a case-control design involving 50 people with active TB, 34 household contacts with a positive IGRA test and 30 healthy controls. The expression of miRNA-99b-5p and miRNA-29a-3p was examined using quantitative real-time PCR (q-PCR) method. Examination of TNF- α and IFN- γ levels using the ELISA method. While data analysis was carried out using the ANOVA test and the Kruskal Wallis test and the ROC curve. The results show highly significant differences in the expression of miRNA-99b-5p and miRNA-29a-5p between the three groups (p-value<0.001), ROC curve analysis shows miRNA-99b-5p expression in active TB has a sensitivity of 80% and a specificity of 73.3% with an Area Under the Curve (AUC) of 0.829 (p-value = <0.001). Meanwhile, the ROC curve of miRNA-99b-5p in latent TB has a sensitivity of 75.8% and a specificity of 66.7% with an AUC of 0.742 (p-value = <0.001). Meanwhile, the ROC curve shows that miRNA-29a-3p in active TB has a sensitivity of 84% and a specificity of 93.3% with an AUC of 0.879 (p-value = <0.001). The ROC curve of miRNA-29a-3p in Latent TB has a sensitivity of 84.8% and a specificity of 70% with an AUC of 0.808 (p-value = <0.001). Furthermore, statistically there is no significant correlation between miRNA-99b-5p expression and TNF- α levels in the three groups (p-value > 0.005). Likewise, the expression of miRNA-29a-3p with levels of IFN- γ finds no significant correlation in each group (p-value>0.005). miRNA-99b-5p and miR-29a-3p show good diagnostics in differentiating the three groups. miR-99b-5p and miR-29a-3p in blood are able to differentiate active TB, latent TB and Healthy controls and show that miRNA-99b-5p and miR-29a-3p are useful biomarkers for TB diagnosis.

Keywords: miRNA-99b-5p, miRNA-29a-3p, TNF- α , IFN- γ , active TB, latent TB



BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) paru merupakan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang menghasilkan angka kematian dan morbiditas yang tinggi secara global. Menurut laporan TB global tahun 2022, diperkirakan 10,6 juta orang (kisaran, 9.9-11 juta) perkembangan penyakit TB pada tahun 2021, meningkat 4.5 % dari 10.1 juta (9.5-10.7 juta) pada tahun 2020. Tingkat kejadian TB (kasus baru per 100.000 penduduk per tahun) naik 2.6 % antara tahun 2020 dan 2021, sebaliknya penurunan sekitar 2% per tahun dari 2 dekade sebelumnya. Secara geografis, sebagian besar kasus TB pada 2021 ada di Wilayah WHO di Asia Tenggara (45%), Afrika (23%) dan Pasifik Barat (18%), dengan persentase lebih kecil di Mediterania Timur (8,1%), Amerika (2.9%) dan Eropa (2.2%). Delapan negara penyumbang kasus TB terbanyak dua pertiga dari total global: India (28%), Indonesia (9.2%), Tiongkok (7.4%), Filipina (7.0%), Pakistan (5.8%), Nigeria (4.4%), Bangladesh (3.6%) dan Republik Demokratik Kongo (2.9%) (World Health Organization, 2022).

Menurut WHO Global TB Report 2022 memperkirakan insiden TB di Indonesia mencapai 1.000.000 kasus baru pada tahun 2021. Dengan adanya data tersebut, Indonesia adalah negara dengan beban TB tertinggi kedua di dunia, setelah India (World Health Organization, 2022).

Di seluruh dunia, TB adalah salah satu dari 10 penyebab utama kematian penyebab utama dari agen infeksi tunggal (di atas HIV / AIDS). Jutaan orang terus jatuh sakit dengan TB setiap tahun. Pada tahun 2019 dan 2021, diperkirakan sekitar 1,4 juta kematian (kisaran, 1.3 – 1.5 juta) pasien TB dengan HIV-negatif dan 187.000 kematian (158.000-218.000) di antara orang HIV-positif, untuk total gabungan sebesar 1,6 juta. Data menunjukkan kenaikan dari perkiraan 1,5 juta pada tahun 2020 dan 1,4 juta pada tahun 2019 (World Health Organization, 2022)

Sulawesi Selatan, tercatat jumlah kasus tuberkulosis paru BTA (basil tahan asam) positif sebanyak 11.476 kasus pada tahun 2019. Berdasarkan data dari seluruh kabupaten/kota se-Sulawesi Selatan, Kota Makassar menduduki peringkat pertama dengan jumlah penderita tuberkulosis sebanyak 5.418 kasus, menyusul Kabupaten Gowa sebanyak 1.810 kasus. Data tahun 2016 yang diperoleh dari Bidang Bina P2PL Dinas Kesehatan Kota Makassar, kasus baru penderita tuberkulosis Paru BTA (+) di Puskesmas dan Rumah Sakit tahun 2016 yaitu sebanyak 1.874 penderita dari 2.373 perkiraan sasaran sehingga diperoleh Angka Penemuan Kasus Baru tuberkulosis BTA (+) yaitu 78,97%. Angka ini meningkat dibandingkan tahun 2015 yaitu 1.928 penderita dari 2.600 perkiraan sasaran sehingga didapatkan angka penemuan kasus baru tuberkulosis BTA (+) yaitu 74,15%. Pada tahun 2014 angka penemuan kasus baru tuberkulosis BTA (+) yaitu 73,76% ditemukan 1.918 penderita dari 2.600 sasaran. Prevalensi (seluruh kasus) penyakit tuberkulosis per 100.000 penduduk selama 3

tahun terakhir juga meningkat yaitu tahun 2016 sebanyak 271/100.000 penduduk meningkat dari tahun 2015 yaitu 249/100.000 penduduk dan pada tahun 2014 yaitu 247/100.000 penduduk (Dinas Kesehatan Sulawesi Selatan, 2020).

Mycobacterium tuberculosis, ditularkan oleh orang-orang yang terinfeksi TB paru (paru) yang melepaskan *Mycobacterium tuberculosis* ke udara melalui batuk, bersin atau meludah (WHO, 2019). Setelah terpapar kuman *Mycobacterium tuberculosis* ada empat keadaan yang bisa terjadi yaitu pertama tidak terjadi infeksi (ditandai dengan tes kulit tuberkulin yang negatif), kedua terjadi infeksi kemudian menjadi TB yang aktif (TB primer), ketiga menjadi TB laten dimana mekanisme imun mencegah progresivitas penyakit menjadi TB aktif dan keempat menjadi TB laten tetapi kemudian terjadi reaktivasi dan berkembang menjadi TB aktif dalam beberapa bulan sampai beberapa tahun kemudian. Infeksi TB laten ini didefinisikan sebagai kondisi seseorang yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* tetapi saat ini orang tersebut tidak sakit, tidak mempunyai gejala/*asymptomatic* dan gambaran foto toraks normal (Martin and Hasibuan, 2010)

Sekitar 5 hingga 10% dari individu yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* berkembang menjadi TB aktif pada tahap tertentu. Sisanya, 90 % hingga 95% orang yang terinfeksi tetap tanpa gejala, disebut infeksi TB laten, yang hanya ditentukan oleh bukti sensitisasi imunologis terhadap protein mikobakteri tanpa adanya tanda-tanda klinis dan gejala penyakit aktif (Flynn and Chan, 2001). WHO memperkirakan bahwa hampir sepertiga

dunia populasi dengan hasil *Mycobacterium tuberculosis* purified turunan protein positif. TB laten adalah sumber penyakit yang disebabkan oleh reaktivasi, terutama di negara berkembang dengan jumlah kasus TB yang besar dan tingkat kejadian TB yang tinggi. Risiko reaktivasi TB di antara orang-orang TB laten yang imunokompeten diperkirakan 10% seseorang dengan TB laten, resiko menjadi TB aktif lebih tinggi apabila terjadi perubahan secara klinis, epidemiologis atau gambaran radiologis. Diagnosis dan penatalaksanaan TB laten merupakan salah satu tantangan pemberantasan TB karena tidak ada bukti klinis dan mikrobiologis (Munoz, Stagg and Abubakar, 2015)

Berdasarkan *Sustainable Development Goals (SDGs)* 3 bahwa Indonesia bebas TB tahun 2050 diperlukan strategi melalui berbagai upaya termasuk penelitian dan pengembangan biomarker diagnostik TB. Salah satu aspek penting untuk mengendalikan penyebaran TB paru adalah mendiagnosisnya pada tahap awal. Namun, sistem uji yang umum digunakan saat ini masih kurang. Selain itu, tes saat ini masih kurang dapat membedakan antara TB aktif dan TB laten.

Diagnosis TB masih menjadi masalah global dengan kesalahan diagnosis yang dapat meningkatkan angka morbiditas dan mortalitas. Program tuberkulosis nasional di Negara endemis penyakit terus berlanjut mengandalkan sebagian besar pada mikroskop smear langsung, kultur padat, radio-tes kulit grafi dan *Tuberculin Skin test (TST)* (Ndzi *et al.*, 2019). Bayi kurang dari enam tahun tidak dapat menghasilkan dahak untuk tes

konfirmasi untuk TB. *Tuberculin Skin test* (TST) tidak spesifik untuk identifikasi *Mycobacterium tuberculosis*. Diagnosis dengan kultur *Mycobacterium tuberculosis* sebagai *gold standart* untuk TB juga sangat memakan waktu dan tidak terlalu cocok untuk TB ekstra paru. Diagnosis tuberkulosis BTA-negatif dan ekstra-paru terus menimbulkan tantangan klinis yang substansial dengan TB pediatrik karena sulitnya pengambilan sampel dahak. Tes FERON-TB yang dikembangkan dapat membantu pada kasus TB tetapi memiliki batas yang tidak dapat membedakan antara laten dan TB aktif serta tidak dapat digunakan untuk mengontrol penderita TB yang menjalani pengobatan obat anti Tuberkulosis (OAT). Oleh karena itu, diperlukan metode diagnostik yang lebih efisien dengan spesimen alternatif seperti darah, feses dan urin yang dapat diambil dari semua kelompok umur. Salah satu penanda biologis yang sedang dievaluasi untuk TB adalah *microRNA (miRNA)*. *miRNA* telah diperkenalkan sebagai biodiagnostik baru yang banyak terlibat dalam beberapa kasus seperti kanker, penyakit jantung, kehamilan, diabetes, psoriasis dan penyakit menular. Banyak mikroorganisme termasuk *Mycobacterium tuberculosis* menyebabkan perubahan epigenetik selama infeksi. Proses epigenetik adalah suatu perubahan ekspresi gen yang diturunkan namun tidak terdapat perubahan sekuens DNA pada gen terkait. Proses epigenetik mencakup *metilasi DNA*, modifikasi histon dan *microRNA (miRNA)* (Behrouzi *et al.*, 2019).

microRNA (miRNA) adalah kelas molekul RNA untai tunggal dengan panjang 18-25 nukleotida yang berfungsi dalam regulasi ekspresi gen

dengan menghambat peran gen sarannya pada tahap pasca transkripsi dari ekspresi gen. *miRNA* merupakan asam ribonukleat yang tidak mengkode protein dengan transkrip akhir yang berinteraksi dengan target gen yang mengkode mRNA. *miRNA* bekerjasama dengan elemen pengatur lain seperti faktor transkripsi untuk mengontrol translasi mRNA. Kebanyakan *miRNA* dikode pada bagian genom yang dulu dianggap sebagai daerah bukan pengkode. Gen-gen *miRNA* tersebar di dalam genom dan diperkirakan berjumlah 2% - 5% dari gen-gen manusia. *miRNA* sering diekspresikan sebagai transkrip polisistronik. Satu *miRNA* dapat mempunyai banyak mRNA target sehingga diperkirakan bahwa lebih dari 1/3 gen-gen manusia diatur oleh *miRNA* (Wuchty *et al.*, 2012).

miRNA memiliki potensi sebagai biomarker yang berguna untuk diagnosis penyakit, efek terapi dan prognosis. Serta menunjukkan bahwa *miRNA* dikaitkan dengan berbagai penyakit, termasuk kanker dan jantung, kekebalan dan penyakit menular (Zhou *et al.*, 2016). Ketika penyakit muncul, *miRNA* spesifik dari organ lesi dapat dilepaskan ke dalam darah. Dalam banyak penyakit, kandungan *miRNA* dalam darah berbeda secara signifikan dari individu yang sehat. Sampai saat ini, *miRNA* sebagai penanda diagnostik molekuler telah dipelajari dan diterapkan pada kanker, diabetes, gangguan kejiwaan, penyakit jantung dan berbagai penyakit menular (Lu *et al.*, 2019). Terdapat beberapa alasan mengapa para peneliti menggunakan *miRNA* sebagai agen biomarker dan terapi, diantaranya adalah bersifat stabil dalam plasma maupun cairan tubuh lainnya, sulit

terdegradasi dan diekskresikan dalam bentuk eksosom atau mikrovesikel (Chen *et al.*, 2011) . Namun, dibandingkan dengan peran *miRNA* tertentu pada kanker, fungsi biologis dan utilitas diagnostik *miRNA* pada infeksi tuberkulosis sebagian besar tetap sulit dipahami sehingga butuh penelitian lebih lanjut (L. S. Wu *et al.*, 2014).

Saat ini, ribuan urutan *miRNA* manusia terdaftar di registri *miRNA* yang dapat menargetkan sekitar 60% dari semua gen mammalia, yang menunjukkan molekul kecil ini memainkan fungsi fundamental dan global pada proses biologis manusia, termasuk perkembangan, diferensiasi, apoptosis, metabolisme, infeksi virus, dan kanker. *miRNA* juga memodulasi imun bawaan dan adaptif terhadap patogen dengan mempengaruhi sel imun mamalia diferensiasi dan perkembangan penyakit imunologis asal. *MiRNA* sebagai diagnostik atau biomarker prognostik telah dibuktikan dalam berbagai jenis kanker. Namun, peran *miRNA* dalam kerentanan dan resistensi untuk penyakit menular, terutama yang berasal dari bakteri, masih kurang dipahami (Wang *et al.*, 2011).

Pada beberapa penelitian sebelumnya juga telah dilakukan analisis menggunakan *Microarray* untuk mengidentifikasi *miRNAs*, baik pada makrofag, PBMC, serum, darah, dan sputum penderita TB sebagai kandidat biomarker yang berpotensi sebagai biomarker Tuberkulosis (Qi *et al.*, 2012); (Xu *et al.*, 2013); (Wang *et al.*, 2015); (Latorre *et al.*, 2015); (Zhou *et al.*, 2016); (Meng *et al.*, 2014); (Ndzi *et al.*, 2019); (Lu *et al.*, 2019).

Pada penelitian sebelumnya terkait sirkulasi *miRNA* pada pasien dengan TB paru aktif. Hasil penelitian menunjukkan terdapat 59 *miRNA* yang mengalami *upregulation* dan 33 *miRNA* mengalami *downregulation* dibandingkan kontrol sehat (Fu *et al.*, 2011). Salah satunya yang mengalami *upregulation* adalah *miRNA-29a-3p*, hal ini terjadi karena *miRNA-29a-3p* menekan respon imun dengan menginhibisi ekspresi IFN- γ oleh sel T pada pasca transkripsi sehingga dapat meningkatkan kerentanan terhadap TB (Ma *et al.*, 2011).

Pada penelitian lainnya menjelaskan bahwa terdapat sejumlah *miRNA* pada pasien TB yang mengalami peningkatan, di antaranya: *miRNA-710*, *miRNA-881**, *miRNA-882*, *miRNA-877*, *miRNA-146a*, *miRNA-125a-5p*, *miRNA-99b*, dan *miRNA-122*. Namun, hanya *miRNA-99b* yang mengalami peningkatan jumlah secara drastis. *miRNA-99b* secara langsung menargetkan TNFRSF-4 dan TNF- α mRNA untuk mengatur berbagai sitokin selama infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Terjadinya over ekspresi *miRNA-99b-5p* dalam sel dendritik dengan menghambat ekspresi TNF- α , IL-6, IL-12, dan IL-1 β yang memungkinkan bakteri untuk menghindari respon imun pada host dan bertahan hidup dalam fagosit host (Singh *et al.*, 2013).

Belum ada penelitian serupa topik ini dilakukan di Indonesia. Penelitian terkait ekspresi *microRNA* pada penderita Tuberkulosis pada populasi orang Indonesia belum pernah dilakukan. Pada penelitian ini, kami menentukan dua jenis *miRNA* yang dipilih dari beberapa *miRNA* dalam

darah yaitu *miR-99b-5p* dan *miR-29a-3p* yang mengalami upregulasi (Lu *et al.*, 2019) untuk membedakan TB aktif dari TB laten serta kontrol di Kota Makassar sebagai salah satu Kota dengan jumlah penderita Tuberkulosis paru di Indonesia. Penelitian ini nantinya dapat memberikan manfaat terkait informasi atau data terbaru terkait biomarker untuk mendiagnosis secara dini penderita tuberkulosis aktif dan laten, yang seiring dengan *Sustainable Development Goals (SDGs)* 3 bahwa Indonesia bebas TB tahun 2050 perlu strategi melalui berbagai upaya termasuk penelitian dan pengembangan biomarker diagnostik TB serta dapat mengendalikan penyebaran TB paru dengan mendiagnosisnya pada tahap awal.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang diatas, permasalahan yang akan dikaji adalah : Bagaimanakah ekspresi *miRNA-99b-5p* dan *miRNA-29a-3p* sebagai biomarker serta korelasinya dengan kadar TNF- α dan IFN- γ pada penderita Tuberkulosis paru aktif dan Tuberkulosis laten?

Pertanyaan Penelitian sebagai berikut :

1. Apakah ada perbedaan ekspresi *miRNA-99b-5p* antara penderita Tuberkulosis paru aktif, Tuberkulosis laten dan orang sehat ?
2. Apakah ada perbedaan ekspresi *miRNA-29a-3p* antara penderita Tuberkulosis paru aktif, Tuberkulosis laten dan orang sehat ?
3. Apakah *miRNA-99b-5p* dan *miRNA-29a-3p* berpotensi sebagai biomarker Tuberkulosis paru aktif dan Tuberkulosis laten?

4. Apakah ada korelasi ekspresi *miRNA-99b-5p* dengan kadar TNF- α pada penderita Tuberkulosis paru aktif, Tuberkulosis laten dan orang sehat ?
5. Apakah ada korelasi ekspresi *miRNA-29a-3p* dengan kadar IFN- γ pada penderita Tuberkulosis paru aktif, Tuberkulosis laten dan orang sehat?

C. Tujuan Penelitian

1. Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekspresi *miRNA-99b-5p* dan *miRNA-29a-3p* pada penderita Tuberkulosis paru aktif, Tuberkulosis laten dan orang sehat.

2. Tujuan Khusus

- a. Untuk mengetahui ekspresi *miRNA-99b-5p* antara penderita Tuberkulosis paru aktif, Tuberkulosis laten dan orang sehat.
- b. Untuk mengetahui ekspresi *miRNA-29a-3p* antara penderita Tuberkulosis paru aktif, Tuberkulosis laten dan orang sehat.
- c. Untuk menentukan potensi *miRNA-99b-5p* dan *miRNA-29a-3p* sebagai biomarker Tuberkulosis paru aktif dan Tuberkulosis laten?
- d. Untuk mengetahui korelasi ekspresi *miRNA-99b-5p* dengan kadar TNF- α pada penderita Tuberkulosis paru aktif, Tuberkulosis laten dan orang sehat

- e. Untuk mengetahui korelasi ekspresi *miRNA-29a-3p* dengan kadar IFN- γ pada penderita Tuberkulosis paru aktif, Tuberkulosis laten dan orang sehat.

D. Manfaat Penelitian

1. Manfaat dari Aspek Pengembangan Ilmu

Hasil Penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran dan informasi mengenai *miRNA-99b-5p* dan *miRNA-29a-3p* pada penderita Tuberkulosis aktif dan Tuberkulosis laten.

2. Manfaat dari Aspek Aplikasi Klinis

Dengan diketahuinya ekspresi miRNA pada penderita Tuberkulosis paru aktif dan Tuberkulosis laten maka dapat diperoleh biomarker untuk diagnosis dini infeksi Tuberkulosis aktif dan Tuberkulosis laten untuk diagnosis Tuberkulosis.

E. Nilai Kebaharuan Penelitian (Novelty)

Belum ada penelitian serupa topik ini dilakukan di Indonesia. Penelitian terkait ekspresi *microRNA* pada penderita Tuberkulosis pada populasi orang Indonesia belum pernah dilakukan. Pada penelitian ini, kami menentukan dua jenis *miRNA* yang dipilih dari beberapa *miRNA* dalam darah yaitu *miRNA-99b-5p* dan *miRNA-29a-3p* yang mengalami upregulasi (Lu *et al.*, 2019) untuk membedakan TB aktif dari TB laten serta kontrol di

Kota Makassar sebagai salah satu Kota dengan jumlah penderita Tuberkulosis paru di Indonesia.

Penelitian ini nantinya dapat memberikan informasi atau data terbaru terkait biomarker untuk mendiagnosis secara dini penderita tuberkulosis aktif dan laten, ini seiring dengan *Sustainable Development Goals (SDGs)* 3 bahwa Indonesia bebas TB tahun 2030 dimana perlu strategi melalui berbagai upaya termasuk penelitian dan pengembangan biomarker diagnostik TB agar dapat mengendalikan penyebaran TB paru di Indonesia dengan mendiagnosisnya pada tahap awal.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. BEBAN TB GLOBAL

Pada Jaman Romawi Kuno, Hipocrates mendeskripsikan Tuberkulosis sebagai penyakit paru-paru atau phthisis, sebuah terminasi yang digunakan sampai awal abad ke 20 masehi. Pada awal abad ke 17 masehi dan selama 200 tahun berikutnya epidemik tuberkulosis atau disebut pula white plague melanda Eropa dan menjadi penyebab meningkatnya angka mortalitas (Eisenach *et al.*, 1993). Tuberkulosis telah menjadi bagian dari sejarah peradaban manusia selama ribuan tahun dan gejala penyakit tuberkulosis telah diketahui dengan melakukan identifikasi DNA *Mycobacteria* pada mumi Mesir yang berusia 3000 dan 2400 tahun sebelum masehi (Cru and Clayton, 1998) ; (Donoghue, 2014) ; (Rothschild *et al.*, 2001). Keberadaan penyakit Tuberkulosis pada sejarah panjang peradaban manusia, *Mycobacterium tuberculosis* baru diketahui sebagai agen penyakit tuberkulosis pada tahun 1882 oleh Robert Koch (Daniel, 2006)

Pada awal abad ke 20 masehi, terjadi peningkatan sanitasi lingkungan di Eropa dan Amerika Serikat yang dapat membantu mengurangi wabah Tuberkulosis. Adanya program pengendalian penyakit Tuberkulosis bersama penggunaan obat anti TB yang tepat guna terbukti dapat menurunkan tingkat infeksi dan kematian. Pada pertengahan abad ke 20 masehi, fakta menunjukkan bahwa penyakit Tuberkulosis sudah dapat diberantas dan hampir hilang. Hal ini menyebabkan menurunnya perhatian

negara Industri tentang wabah Tuberkulosis, sehingga program pengendalian penyakit Tuberkulosis mulai terbengkalai. Namun, pada kenyataannya akibat perkembangan obat terapi TB menyebabkan TB bukan lagi menjadi masalah utama dalam isu kesehatan masyarakat. Tetapi, walau insiden Tuberkulosis makin berkurang, penyakit tersebut tidak pernah benar-benar hilang. Sehingga pada tahun 1985, epidemi TB mulai merebak kembali di Negara perindustrian (Programs, Brudney and Dobkin, 1991) ; (Daniel, 2006). Faktor utama yang menyebabkan kemunculan wabah penyakit TB, selain kurangnya perhatian terhadap program penanggulangan Tuberkulosis adalah adanya penyakit HIV/AIDS (Programs, Brudney and Dobkin, 1991).

Pada tahun 1993, WHO mendeklarasikan TB sebagai penyakit Global yang berbahaya, dan pada tahun 1998 berama dengan Internasional Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) dan mitra organisasi Internasional lainnya mulai membentuk program stop TB, yang merupakan sebuah strategi global untuk mengendalikannya penyakit TB, yang kemudian berkembang menjadi kerjasama global, yaitu kemitraan STOP-TB. WHO mengestimasi bahwa sepertiga penduduk dunia telah terinfeksi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dengan delapan juta kasus TB baru dan dua juta kematian penduduk disebabkan oleh penyakit TB (WHO, 2009). Rata-rata angka tertinggi kejadian TB $\geq 300/100.00$ penduduk/tahun ditemukan di daerah Subahara Afrika, Indonesia dan Filipina. Jika program pengendalian TB yang efektif belum juga ditemukan, WHO mengestimasi

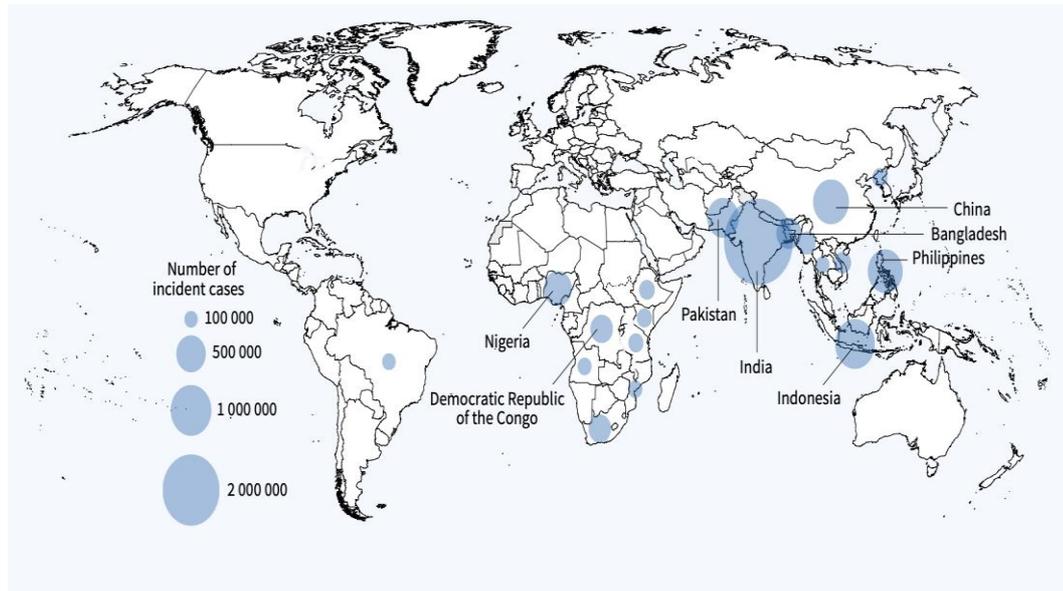
bahwa pada tahun 2020, *Mycobacterium tuberculosis* akan menginfeksi kurang lebih 1000 juta penduduk dunia. 150 juta akan mengalami penyakit TB dan 36 juta penduduk akan mati karena terserang TB (WHO, 2009).

Publikasi pertama WHO semenjak aplikasi strategi Directly Observed Short Course Therapy (DOTS) tahun 1995 dengan jumlah 3,4 juta kasus baru. Angka tersebut memberikan gambaran mengenai peningkatan angka temuan kasus TB baru selama kurang lebih 12 tahun. Terdapat perbedaan besar antara jumlah etimasi selama tahun 2011 yang dapat digaris bawahi mengenai kemampuan negara yang terkait jejaring National TB control Program (NTP) yang secara tepat dapat mendiagnosis jumlah pasti kasus TB, dibandingkan jumlah yang tidak terdiagnosis dan tidak diobati Hal ini tentu saja akan mengarahkan perhatian dunia pada konsekuensi yang berlawanan yang secara rinci berkaitan dengan latar belakang kejadian resistensi terhadap OAT yang cenderung meningkat (Malla *et al.*, 2012).

Dengan adanya deklarasi TB sebagai global emergency oleh WHO pada tahun 1993, implementasi penggunaan kombinasi OAT yang dikenal sebagai strategi DOTS dapat secara suka dilakukan pada semua wilayah di dunia. Hal ini berimbas pada menurunnya angka prevalensi TB.

Secara geografis, pada tahun 2021, penambahan kasus TB berada di wilayah WHO Asia Tenggara (45%), Afrika (23%) dan Pasifik Barat (18%), dengan proporsi yang lebih kecil di Mediterania timur (8,1 %), Amerika (2,9%) dan Eropa (2,2%). 30 negara dengan beban TB tinggi menyumbang 87% dari semua perkiraan kasus insiden di seluruh dunia, dan delapan dari

negara-negara ini (Gambar 2.1) menyumbang lebih dari dua pertiga dari total global: India (28%), Indonesia (9,2%), Cina (7,4%), Filipina (7,0%), Pakistan (5,8%), Nigeria (4,4%), Bangladesh (3,6%) dan Republik Demokratik Kongo (2,9%).



Gambar 2.1. Negara-negara dengan Beban Tinggi TB Menurut WHO Tahun 2021 (World Health Organization, 2022)

Tingkat keparahan epidemi TB secara global, dalam hal jumlah insiden kasus TB per 100.000 penduduk per tahun, sangat bervariasi antar negara, kurang dari lima hingga lebih dari 500 kasus baru dan kambuh per 100.000 penduduk per tahun pada tahun 2021, 47 negara memiliki insiden TB yang rendah (<10 kasus per 100.000 penduduk per tahun), sebagian besar di wilayah WHO Amerika dan wilayah Eropa, ditambah beberapa negara di wilayah Mediterania timur dan Pasifik Barat. Negara dengan insiden rendah ditempatkan dengan baik untuk menargetkan eliminasi TB. Ada 150–400 kasus per 100.000 penduduk di sebagian besar dari 30 negara dengan

beban TB tinggi, dan lebih dari 500 kasus per 100.000 penduduk di republik afrika tengah, Gabon, Lesotho, Filipina dan Afrika Selatan (World Health Organization, 2022)

Kemunculan penyakit TB secara global, tidak hanya berkaitan dengan tingginya tingkat ko-infeksi dengan HIV, namun disebabkan pula adanya strain kuman TB yang resisten dengan obat anti-TB sebagai contoh adanya outbreak di Kota New York pada awal tahun 1990-an. Bentuk penyakit TB yang menyerang merupakan kuman TB yang resisten terhadap hampir semua obat anti TB dan umumnya menyerang pasien yang mengidap HIV. Ditemukan tiga kasus TB yang resisten terhadap satu obat anti TB dan satu dari lima kejadian resisten terhadap lebih dari satu obat anti TB (Mathema *et al.*, 2006)

TB yang resisten terhadap obat (MDR/RR-TB) terus menjadi ancaman kesehatan masyarakat. Resistensi terhadap rifampisin yang merupakan obat lini pertama yang paling efektif menjadi perhatian terbesar. Resistensi terhadap rifampisin dan isoniazid didefinisikan sebagai TB *Multidrug-Resisten* (MDR-TB). Baik MDR-TB dan *Rifampicin-Resistant* TB (RR-TB) memerlukan pengobatan dengan obat lini kedua (World Health Organization, 2022)

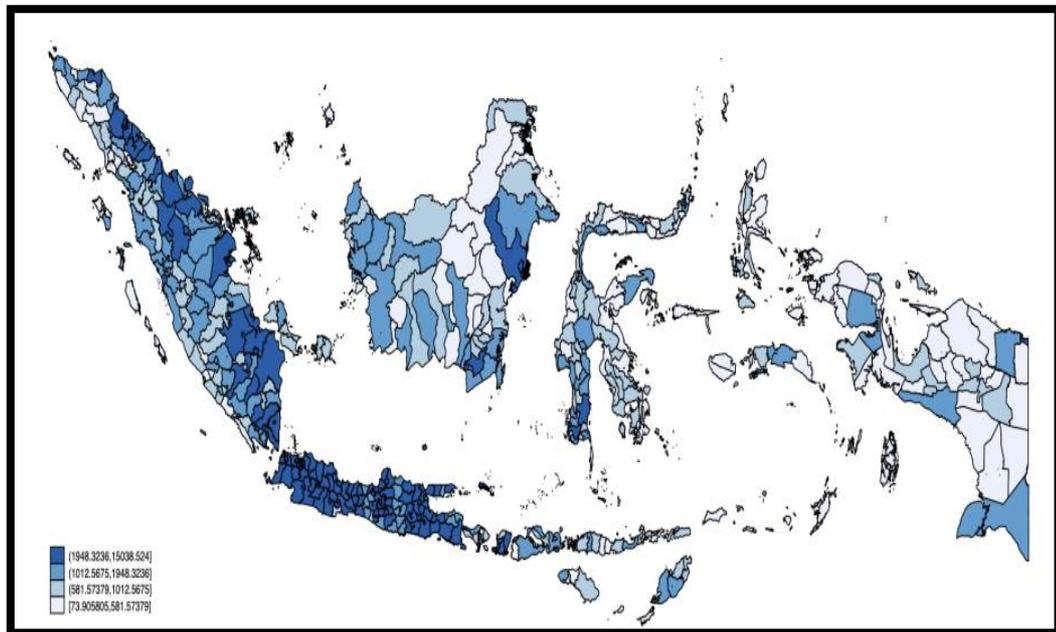
Secara global, perkiraan jumlah orang yang dengan MDR-TB atau RR-TB (MDR/RR-TB) setiap tahun relatif stabil antara tahun 2015 dan 2020, tetapi meningkat pada tahun 2021. Diperkirakan ada 450.000 kasus insiden (95% UI: 399.000–501.000) pada tahun 2021, naik 3,1% dari 437.000 (95%

UI: 390.000–483.000) pada tahun 2020. Peningkatan insiden TB secara keseluruhan antara tahun 2020 dan 2021, diperkirakan disebabkan oleh dampak pandemi COVID-19 pada deteksi TB (World Health Organization, 2022).

Pada tahun 2021, perkiraan proporsi kasus TB yang memiliki MDR/RR-TB adalah 3,6% (95% ui: 2,7–4,4%) di antara kasus baru dan 18% (95% UI: 11–26%) di antara mereka yang sebelumnya diobati ; angka pada tahun 2015 masing-masing adalah 3,9% (95% ui: 2,8–5,0%) dan 20% (95% ui: 9,5–31%). Tiga negara menyumbang 42% secara global pada tahun 2021 : India (26%) Federasi Rusia (8,5%), dan Pakistan (7,9%). Proporsi tertinggi (>50% dari kasus yang sebelumnya diobati dengan MDR/RR-TB) ditemukan di Federasi Rusia dan di beberapa negara di Eropa Timur dan Asia Tengah (World Health Organization, 2022).

B. TUBERKULOSIS DI INDONESIA

Tuberkulosis merupakan salah satu masalah utama kesehatan masyarakat di Indonesia dan termasuk salah satu sasaran *Millennium Development Goals* (MDGs) dalam pemberantasan penyakit di dunia. Penyakit TB disebabkan oleh infeksi bakteri berbentuk batang (basil) yang dikenal dengan nama *Mycobacterium tuberculosis* (WHO, 2019).



Gambar 2.2. Sebaran Jumlah insiden Tuberkulosis berdasarkan Kota dan Kabupaten di Indonesia, 2018 (WHO, 2019)

Jumlah kasus baru TB di Indonesia sebanyak 420.994 kasus pada tahun 2017 (data per 17 Mei 2018). Berdasarkan jenis kelamin, jumlah kasus baru TBC tahun 2017 pada laki-laki 3 kali lebih tinggi dibandingkan pada perempuan. Begitu juga yang terjadi dinegara-negara lain hal ini terjadi kemungkinan karena laki-laki lebih terpapar pada faktor resiko TBC misalnya merokok dan kurangnya ketidakpatuhan minum obat. survei ini menemukan bahwa seluruh partisipan laki-laki yang merokok sebanyak 68,5% dan hanya 3,7% partisipan perempuan yang merokok (World Health Organization, 2017)

Berdasarkan survei prevelensi Turbekulosis tahun 2013-2014 prevelensi TBC dengan konfirmasi bakteriologis di Indonesia sebear 759

per 100.000 penduduk berumur 15 tahun keatas dan prevalensi TBC BTA positif sebesar 257 per 100.000 penduduk berumur 15 tahun keatas.

Berdasarkan Rikesdas 2017 semakin bertambah usia, pravelensinya semakin tinggi, kemungkinan terjadi reaktivasi TBC lebih lama dibandingkan kelompok umur dibawahnya. Sebaliknya, semakin tinggi kuintil indeks kepemilikan (yang menggambarkan kemampuan social ekonomi) semakin rendah prevalensi Tuberkulosis.

Gambaran kesakitan menurut pendidikan menunjukkan prevalensi semakin rendah seiring dengan tingginya tingkat pendidikan. Kesakitan Tuberkulosis menurut kuintil indeks kepemilikan menunjukkan tidak ada perbedaan antara kelompok terbawah sampai dengan menengah keatas. Hal ini berarti resiko Tuberkulosis dapat terjadi pada hamper semua tingkatan social ekonomi.

Angka notifikasi kasus/*case notification rate* (CNR) adalah jumlah semua kasus TBC yang diobati dan dilaporkan diantara 100.000 penduduk yang ada di suatu wilayah tertentu yang apabila dikumpulkan serial, akan menggambarkan kecenderungan (*trend*) meningkat atau menurunnya penemuan kasus dari tahun ke tahun disuatu wilayah.

Berdasarkan data *Global Report TB 2019*, Indonesia menempati posisi ke tiga setelah India dan Cina. Diperkirakan 10,0 juta orang (kisaran, 9,0-11,1 juta) perkembangan penyakit TB pada tahun 2018, jumlah yang relatif stabil dalam beberapa tahun terakhir dari 500 kasus baru per 100.000 penduduk per tahun (WHO, 2019).

C. Tinjauan Umum *Mycobacterium tuberculosis*

1. Morfologi Bakteri *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis berbentuk batang lurus atau sedikit melengkung, tidak berspora dan tidak berkapsul. Bakteri ini berukuran lebar 0,3 – 0,6 μm dan panjang 1 – 4 μm . Dinding *Mycobacterium tuberculosis* sangat kompleks, terdiri dari lapisan lemak cukup tinggi (60%). Penyusun utama dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* adalah asam mikolat, lilin kompleks (complex-waxes), trehalosa dimikolat yang disebut cord factor, dan mycobacterial sulfolipids yang berperan dalam virulensi. Asam mikolat merupakan asam lemak berantai panjang (C60 – C90) yang dihubungkan dengan arabinogalaktan oleh ikatan glikolipid dan dengan peptidoglikan oleh jembatan fosfodiester. Unsur lain yang terdapat pada dinding sel bakteri tersebut adalah polisakarida seperti arabinogalaktan dan arabinomanan. Struktur dinding sel yang kompleks tersebut menyebabkan *Mycobacterium tuberculosis* bersifat tahan asam, yaitu apabila sekali diwarnai akan tetap tahan terhadap upaya penghilangan zat warna tersebut dengan larutan asam – alkohol. Atas dasar karakteristik yang unik inilah bakteri dari genus *Mycobacterium* seringkali disebut sebagai Bakteri Tahan Asam (BTA) atau acidfast bacilli (AFB) (Perhimpunan Dokter Paru Indonesia, 2021).



Gambar 2.3. Struktur morfologi *Mycobacterium tuberculosis* (Kaihena, 2013)

Genom *Mycobacterium tuberculosis* terdiri dari 4,41 Mb (mega base) pasangan basa dan mengandung 4.009 gen. Keunikan dari genom *Mycobacterium tuberculosis* dibandingkan dengan genom bakteri lain adalah pada banyaknya gen yang terlibat dalam proses lipogenesis dan lipolisis. Gen tersebut diduga terkait dengan sintesis dan pemeliharaan dinding sel bakteri. Sekitar 52% dari protein yang disintesis dari gen tersebut telah diketahui fungsinya. Dari analisis genetik tersebut, diketahui bahwa *Mycobacterium tuberculosis* memiliki potensi untuk bertahan hidup dalam lingkungan yang bervariasi, termasuk dalam lingkungan dengan tekanan oksigen yang sangat rendah. Hal ini menyebabkan *Mycobacterium tuberculosis* dapat bertahan dormant di dalam tubuh dalam kondisi yang tidak optimal dan dapat mengalami reaktivasi di kemudian hari jika situasi lingkungan memungkinkan. *Mycobacterium* memiliki 120 spesies dengan delapan spesies di antaranya adalah *M. tuberculosis complex*. *M.*

tuberculosis complex terdiri dari delapan spesies yaitu: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. Caprae*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canneti*, *M. pinnipedii* (Perhimpunan Dokter Paru Indonesia, 2021).

Genus *Mycobacterium* merupakan kelompok bakteri gram positif, berbentuk batang, berukuran lebih kecil dibandingkan bakteri lainnya. Genus ini mempunyai karakteristik unik karena dinding selnya kaya akan lipid dan lapisan tebal peptidoglikan yang mengandung arabinogalaktan, lipoarabinomanan dan asam mikolat. Asam mikolat tidak biasa dijumpai pada bakteri lain dan hanya dijumpai pada dinding sel *Mycobacterium* dan *Corynebacterium*. *Mycobacterium tuberculosis* dibedakan dari sebagian besar bakteri lainnya karena bersifat patogen dan dapat berkembangbiak dalam sel fagosit hewan dan manusia. Pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* relatif lambat dibandingkan bakteri lainnya. *Mycobacterium tuberculosis* tidak menghasilkan endotoksin maupun eksotoksin. Bagian selubung *Mycobacterium tuberculosis* mempunyai sifat pertahanan khusus terhadap proses mikobakterisidal sel hospes. *Mycobacterium tuberculosis* juga mempunyai sifat khusus yaitu tahan terhadap asam pada pewarnaan, oleh karena itu disebut pula sebagai Basil Tahan Asam (BTA), kuman ini cepat mati dengan sinar matahari langsung, tetapi dapat bertahan hidup beberapa jam ditempat yang gelap dan lembab. Dalam jaringan tubuh kuman ini dapat dorman selama beberapa tahun. Dinding sel kuman ini kaya akan lipid yang berfungsi melindungi mikobakteri dari proses

fagolisosom, hal ini dapat menerangkan mengapa mikobakteri dapat hidup pada makrofag normal yang tidak teraktivasi (Kaihena, 2013).

Studi genetik molekuler terbaru telah menunjukkan *Mycobacterium tuberculosis* adalah anggota dari *Mycobacterium tuberculosis* kompleks yang mencakup enam spesies terkait erat lainnya: *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, dan *M. canetti*. Meskipun semua anggota *Mycobacterium tuberculosis* adalah patogen obligat dan menyebabkan Tuberkulosis, dan menunjukkan sifat fenotipik dan jangkauan inang yang berbeda (Ahmad, 2011).

2. Fisiologi Pertumbuhan

Mycobacterium tuberculosis dapat tahan hidup di udara kering maupun dalam keadaan dingin, atau dapat hidup bertahun-tahun dalam lemari es. Ini dapat terjadi karena kuman berada dalam sifat dorman (tidur). Dari keadaan ini, kuman dapat bangkit kembali dan terjadi reaktivasi (Amin and Bahar, 2014). *Mycobacterium* tidak tahan panas, akan mati pada 60°C selama 15-20 menit. Biakan dapat mati jika terkena sinar matahari langsung selama 2 jam. Dalam dahak, ia dapat bertahan 20-30 jam. Basil yang berada dalam percikan bahan dapat bertahan hidup 8-10 hari. Biakan basil ini dalam suhu kamar dapat hidup hingga 6-8 bulan dan dapat disimpan dalam lemari dengan suhu 20°C selama 2 tahun. Basil ini tahan terhadap berbagai khemikalia dan disinfektan seperti asam sulfat 15%, asam sitrat 3%, phenol 5%, dan NaOH 4%. Basil ini dihancurkan oleh jodium tinctur

dalam 5 menit dan dengan alkohol 80 % akan hancur dalam 2-10 menit (Massi, 2012).

Pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* dapat dilihat tanpa bantuan mikroskop. Koloni bakteri dari spesimen klinik akan tampak pertumbuhannya di media agar miring LJ (*Lowenstein–Jensen*) berbentuk cembung, kering, berwarna kuning gading. Jika dipasteurisasi pada suhu 60°C, *Mycobacterium tuberculosis* ini akan mati dalam waktu 15 – 20 menit. *Mycobacterium tuberculosis* juga sangat rentan terhadap paparan sinar matahari dan radiasi sinar ultraviolet, tetapi bakteri ini mampu bertahan hidup pada suhu rendah (dapat bertahan hidup dalam lemari es). Hal ini disebabkan karena bakteri tersebut berada dalam keadaan *dormant*. Pada kondisi tersebut bakteri dapat diaktifkan dan menjadi bakteri tuberkulosis yang aktif (Perhimpunan Dokter Paru Indonesia, 2021)

Berdasarkan pewarnaan gram, *Mycobacterium tuberculosis* sulit diklasifikasikan kedalam gram positif atau gram negatif, hal tersebut disebabkan *Mycobacterium tuberculosis* tidak memberikan karakteristik kimia dari keduanya. Jika pewarnaan gram dilakukan, akan dihasilkan warna merah yang sangat lemah dan tidak merata atau sama sekali tidak memberikan warna. Pewarnaan harus dilakukan dengan metode *Ziehl-Neelsen* positif untuk basil tahan asam (BTA) sehingga *Mycobacterium tuberculosis* akan terlihat berbentuk batang berwarna merah. Basil tuberkulosis ditandai dengan tahan asam, sifat tahan asam ini tergantung pada integritas selubung yang terbuat dari *wax-D*. Oleh sebab itu

Mycobacterium tuberculosis disebut Basil Tahan Asam (BTA) (Perhimpunan Dokter Paru Indonesia, 2021).

D. Tinjauan Umum Penyakit Tuberkulosis

1. Definisi Tuberkulosis

Tuberkulosis merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh basil *Mycobacterium Tuberculosis* complex, sebagian besar pada manusia disebabkan oleh spesies *Mycobacterium tuberculosis*. Sebagian besar kuman Tuberkulosis menyerang paru, tetapi dapat juga mengenai organ tubuh lainnya. Biasanya ditransmisikan dari satu orang ke orang lainnya melalui *airborne droplet* (World Health Organization, 2017). Tuberkulosis merupakan salah satu penyakit menular penyebab utama kematian, dengan 95% kematian terjadi di negara berkembang. Agen penyebab *Mycobacterium tuberculosis*, yang memiliki kemampuan untuk menghindari sistem kekebalan inang demi kelangsungan hidup intraselulernya (Sabir *et al.*, 2018).

Mycobacterium tuberculosis adalah bakteri patogen yang ditularkan melalui udara dan dapat dengan mudah ditularkan dari orang ke orang dengan batuk, bersin atau meludah, dan menghirup hanya beberapa basil akan membuat orang yang sehat terinfeksi oleh *Mycobacterium tuberculosis* (Agarwal, Sharma and Nyati, 2019).

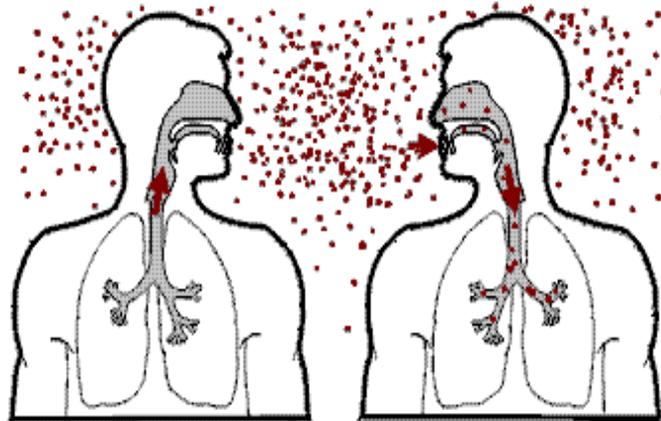
Dalam sejarah, penyakit Tuberkulosis sama dengan penyakit menular lainnya seperti cacar, pes dan kolera yang pernah menyebar luas di seluruh

dua. Tanggal 24 Maret 1882, Sarjana Jerman Robert Koch mengumumkan telah menemukan mikobakteria berupa bakteri patogenik Tuberkulosis, penemuan itu telah mendatangkan terobosan bagi pengontrolan Tuberkulosis. Selanjutnya seiring dengan berhasilnya penelitian dan pembuatan obat-obatan anti tuberkulosis, pandemik tuberkulosis dapat dikontrol dengan efektif dan ternyata musnah di sejumlah daerah. Untuk memperingati penemuan Robert Koch, WHO dan Uni Internasional Anti tuberkulosis dan Penyakit paru-paru menetapkan tanggal 24 Maret setiap tahun sebagai hari Tuberkulosis sedunia.

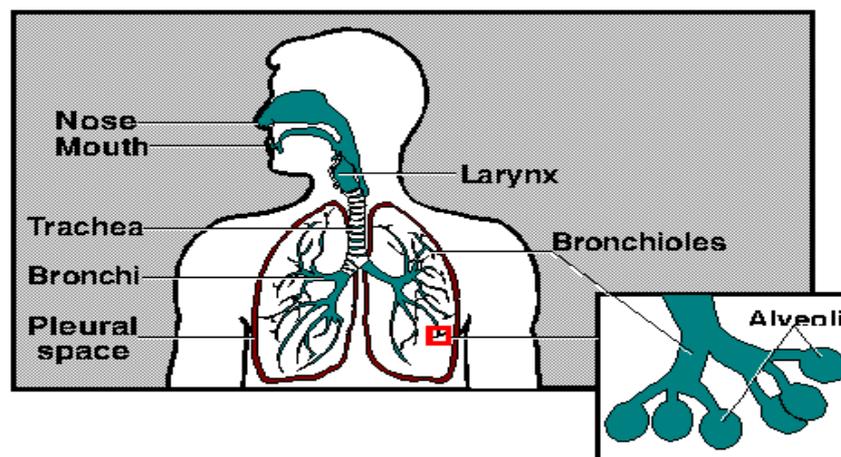
2. Transmisi Infeksi *Mycobacterium tuberculosis*

Tuberkulosis menular melalui udara yang tercemar dengan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang dilepaskan pada saat penderita TB batuk atau bersin, penderita menyebarkan bakteri ke udara dalam bentuk *droplet nuclei* (percikan dahak) yang merupakan partikel berukuran 1-5 μ m (Ahmad, 2011). Setelah menghirup droplet, *Mycobacterium tuberculosis* dapat mencapai alveolus. Masuknya *Mycobacterium tuberculosis* ini akan segera diatasi oleh mekanisme imunologis non spesifik. Makrofag alveolus akan menfagosit kuman tuberkulosis dan biasanya sanggup menghancurkan sebagian besar kuman tuberkulosis. Akan tetapi, pada sebagian kecil kasus, makrofag tidak mampu menghancurkan kuman Tuberkulosis dan kuman akan bereplikasi dalam makrofag. Kuman Tuberkulosis dalam makrofag yang terus berkembang biak, akhirnya akan membentuk koloni di tempat tersebut. Lokasi pertama koloni kuman

Tuberkulosis di jaringan paru disebut Fokus Primer GOHN. Pada sebagian besar individu dengan sistem imun yang berfungsi baik, begitu sistem imun seluler berkembang, proliferasi kuman *Mycobacterium tuberculosis* terhenti. Namun, sejumlah kecil kuman *Mycobacterium tuberculosis* dapat tetap hidup dalam granuloma. Bila imunitas seluler telah terbentuk, kuman *Mycobacterium tuberculosis* baru yang masuk ke dalam alveoli akan segera dimusnahkan. Selama berminggu-minggu awal proses infeksi, terjadi pertumbuhan logaritmik kuman Tuberkulosis sehingga jaringan tubuh yang awalnya belum tersensitisasi terhadap tuberkulin, mengalami perkembangan sensitivitas. Pada saat terbentuknya kompleks primer inilah, infeksi Tuberkulosis primer dinyatakan telah terjadi. Hal tersebut ditandai oleh terbentuknya hipersensitivitas terhadap tuberkuloprotein, yaitu timbulnya respons positif terhadap uji tuberculin. Selama masa inkubasi, uji tuberculin masih negatif. *Mycobacterium tuberculosis* dapat pula menyebar melalui pembuluh darah atau kelenjar getah bening. Oleh sebab itu infeksi Tuberkulosis dapat menginfeksi hampir seluruh organ tubuh seperti : paru-paru, otak, ginjal, saluran pencernaan, tulang, dan kelenjar getah bening, meski demikian organ tubuh yang paling sering terkena yaitu paru-paru (Crevel, Ottenhoff and van der Meer, 2002).



Gambar 2.4. Penyebaran droplet dari satu individu ke individu lainnya.



Gambar 2.5. Tuberkulosis dimulai ketika nukleus droplet mencapai alveoli (Todar, 2005)

3. Mekanisme Patogenitas Tuberkulosis Paru

Manusia adalah reservoir utama *Mycobacterium tuberculosis* dan penyebaran dari manusia ke manusia terutama terjadi melalui menghirup aerosol pernapasan dan sekresi yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* yang dihembuskan dari pasien Tuberkulosis paru aktif. Granuloma dianggap sebagai hasil dari perantara sel pelindung dan telah

menjadi pusat studi patogenesis TB dan patogen intraseluler lainnya (Rao *et al.*, 2019)

Saat terhirup, *Mycobacterium tuberculosis* mencapai jalan napas utama dan alveoli, kemudian oleh Makrofag alveolar akan memfagosit patogen dan mengisolasi melalui proses invaginasi membran yang akhirnya berujung pada pembentukan fagosom. Pada saat itu, *Mycobacterium tuberculosis* dan Makrofag saling memperebutkan kendali. Perjuangan bakteri untuk bertahan hidup dan upaya makrofag untuk menahan infeksi (Munoz, Stagg and Abubakar, 2015).

Setelah pembentukan fagosom, makrofag dan sel dendritik muncul melalui molekul kelas II major histocompatibility complex (MHC). Sel-sel penyaji antigen akan mengekspresikan molekul MHC ini ke kelenjar getah bening mediastinal lokal, di mana mereka akan mengaktifkan CD4⁺ Sel T-helper (Th). Sel-sel ini mengatur sekresi sitokin melalui pensinyalan endokrin dan parakrin dan berfungsi dalam pembentukan dan pemeliharaan granuloma melalui kaskade sinyal respons inflamasi proinflamasi (Interferon-gamma [IFN- γ], Interleukin-2 [IL-2], dan faktor nekrosis tumor (TNF- α), yang mengarah pada sel mononuklear dan limfosit T. Sel ini akan bersama-sama dengan limfosit B dan sel dendritik, membangun granuloma. CD4⁺ juga berfungsi untuk aktivasi CD8⁺ sel T sitotoksik dan limfosit B, serta diferensiasi menjadi subtype sel Th yang beragam tergantung pada lingkungan sitokin, dan berbagai jenis sel Th akan berkembang (Ahmad, 2011).

IFN- γ mendorong produksi sel Th1 dan menghasilkan klon ekspansi serta diferensiasi menjadi sel memori; sebaliknya, IL-10 dan IL-4 menghambat perkembangannya. Sel Th1 mengatur imunitas yang dimediasi sel dan mengaktifkan sel NK melalui IFN- γ sekresi. Kadar IL-4, IL-5, dan IL-10 yang tinggi diperlukan untuk diferensiasi sel Th2, ekspansi klonalnya, dan pembentukan sel memori. Sel Th2 bertanggung jawab untuk mengontrol imunitas humoral dan aktivasi sel B ke dalam sel plasma. Sistem imun adaptif dapat memakan waktu selama 42 hari setelah paparan infeksi, sejumlah besar makrofag teraktivasi dibawa ke lokasi infeksi dan membentuk granuloma, yang juga ditarik oleh limfosit, epiteloid, dan sel giant. Dengan menghilangkan granuloma oksigen, penurunan nekrosis pH terjadi secara internal, dan mencegah replikasi bakteri tetapi memungkinkan terjadinya dormansi. Namun, kemungkinan masih bisa terjadi replikasi, karena tanpa ini, isoniazid tidak akan efektif melawan TB laten, karena hanya bersifat bakterisidal terhadap *Mycobacterium tuberculosis*. Makrofag dan sel dendritik juga akan mengangkut *Mycobacterium tuberculosis* ke kelenjar getah bening lokal selama pembentukan granuloma, memungkinkan penyebaran infeksi, terutama ke area yang teroksigenasi dengan baik seperti apeks paru, kelenjar suprarenal, korteks otak, dan tulang serta sendi (Ahmad, 2011).

Mycobacterium tuberculosis ke dalam tubuh terhirup melalui saluran pernapasan. Sebelum masuk ke saluran nafas bawah, pada tahap awal (tahap I), hambatan fisik adalah nasofarings dan saluran pernapasan

bagian atas oleh sistem pertahanan mukosilier bronkus pada ephitel bronchus (anti microbial peptide), karena ukurannya kecil (1 – 5 um) memungkinkan untuk masuk ke dalam saluran pernapasan bagian bawah dengan cara menembus sistem mukosilier saluran nafas kemudian mencapai dan bersarang di *bronchioles* dan *alveolus* untuk selanjutnya makrofag alveolar menelan (memfagosit) basil dan sering menghancurkannya. Penghancuran mikobakteri tergantung pada kekuatan *microbicidal instrinsik host* memfagosit basil dan factor virulensi mikobakteriyang tertelan. Akan tetapi pada sebagian kecil kasus makrofag tidak mampu menghancurkan kuman TB dan kuman akan bereplikasi dalam makrofag (Ahmad, 2011) .

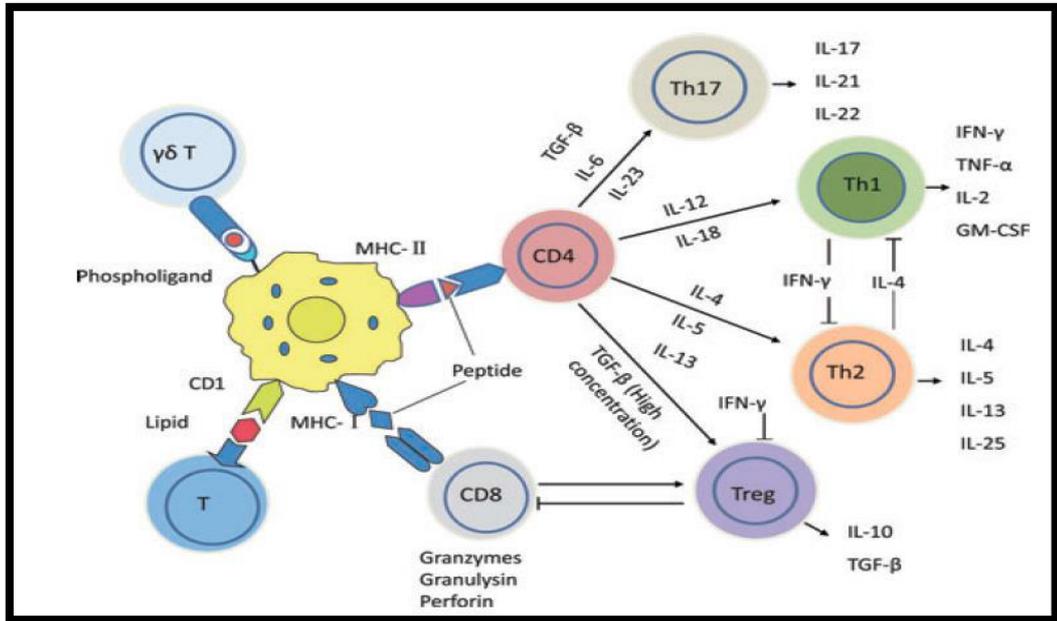
Kuman TB daam makrofag akan terus berkembang biak, akhirnya akan membentuk koloni di tempat jaringan paru disebut “Fokus primer” atau GOHN. Dari fokus primer, kuman TB menyebar melalui saluran limfe menuju kelenjar limfe regional, yaitu kelenjar limfe yang mempunyai saluran limfe ke lokasi fokus primer. Penyebaran ini menyebabkan terjadinya inflamasi di saluran limfe (limfangitis) dan di kelenjar limfe (limfadenitis) yang terkena. Jika fokus primer terletak di lobus paru bawah atau tengah, kelenjar limfe dan akan terlibat adalah kelenjar limfe parahilus, sedangkan jika fokus primer terletak di apeks paru, yang akan terlibat adalah kelenjar paratrakeal. Kompleks primer merupakan gabungan antara fokus primer, kelenjar limfe regional yang membesar (limfadenitis) dan saluran limfe yang meradang (limfangitis). Fakus primer di jaringan paru biasanya mengalami

resolusi secara sempurna membentuk fibrosis atau kalsifikasi setelah mengalami nekrosis perkijuan (lesi primer) dan enkapsulasi.

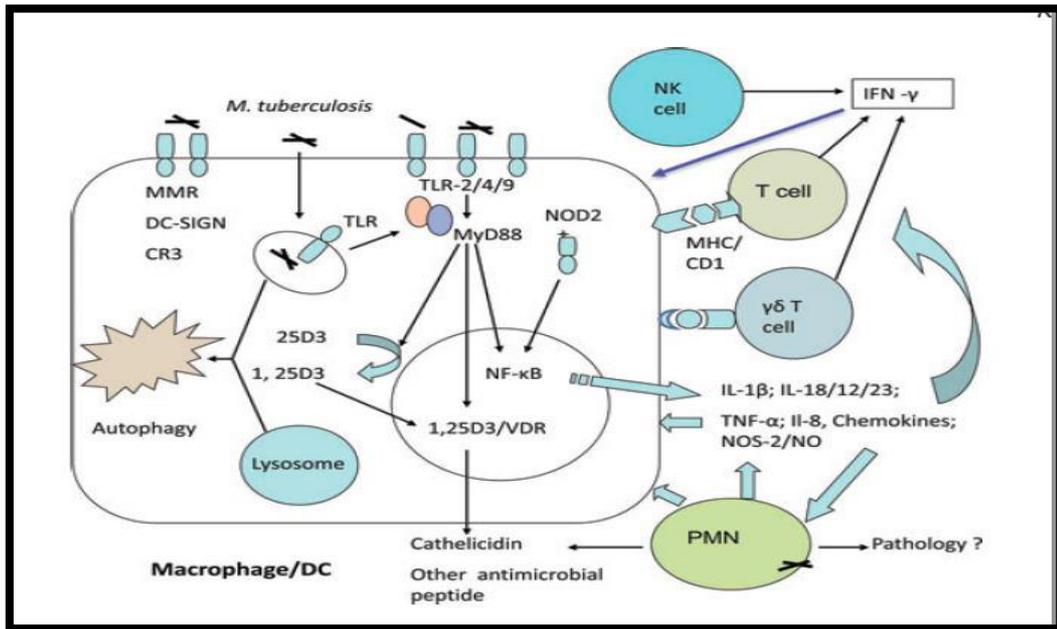
Mikobakteri yang tidak sempat dihancurkan *intracellular* tahap awal melarikan diri dan berkembang biak akibat gagalnya makrofag memfagosit basil TB. Pada tahap kedua monosit dan sel inflamasi tertarik ke paru-paru, monosit berdiferensiasi menjadi makrofag hingga dengan mudah akan menelan kuman TB, tetapi tidak menghancurkannya. Dua sampai tiga minggu setelah infeksi kekebalan antigen spesifik limfosit T yang berkembang biak di dalam lesi awal berupa tuberkel, kemudian mengaktifkan makrofag membunuh mikobakteri intraseluler. Setelah fase ini pertumbuhan awal logaritmik mikobakteri tahap ketiga terhenti. Akibat adanya lesi primer sehingga menghambat pertumbuhan mikobakteri ekstraseluler, akibatnya infeksi dapat menjadi tidak aktif atau tidur (*persisten atau dormant*). Penyakit dapat berkembang lewat penyebaran hematogen yang terjadi setelah infeksi primer pada beberapa bulan atau beberapa tahun setelah *Tuberkulosis post primer*. Dalam kondisi imunitas menurun, *liquefied caseous* fokus memberikan kondisi yang sangat baik untuk pertumbuhan ekstraseluler *Mycobacterium tuberculosis*. Pembentukan rongga *caverne* menyebabkan pecahnya saluran pernapasan di dekatnyamemungkinkan basil menyebar melalui saluran udara ke bagian lain dari paru-paru dan lingkungan luar (Van Crevel *et al.*, 2009)

4. Aspek Immunologi Tuberculosis

Toll-Like Receptors (TLR) adalah reseptor utama dalam makrofag yang digunakan untuk mengenali *Mycobacterium tuberculosis* dan dapat mengaktifkan faktor transkripsi (NF- κ B) untuk menginduksi pelepasan sitokin pro inflamasi. Interferon-gamma (IFN- γ) dan Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) adalah pusat sitokin pro-inflamasi utama untuk perlindungan terhadap infeksi tuberculosis. TNF- α memainkan peran penting dalam pengendalian *Mycobacterium tuberculosis* pertumbuhan makrofag melalui beberapa mekanisme dan memiliki peran sentral dalam pembentukan dan pemeliharaan tuberculosis laten. IFN- γ sangat penting untuk system imun bawaan dan adaptif terhadap infeksi, terutama infeksi bakteri intraseluler. *Mycobacterium tuberculosis* akan menghambat produksi sitokin pro-inflamasi sebagai mekanisme bertahan hidup. Selain itu, kemampuan *Mycobacterium tuberculosis* untuk tinggal dan bereplikasi dalam fagosit memungkinkan *Mycobacterium tuberculosis* untuk bertahan hidup di dalam sel. Mekanisme ini menghindari respon imun sehingga *Mycobacterium tuberculosis* berhasil menginvasi makrofag dengan menghambat fusi fagolisosom dan menetralkan lingkungan asam dari kompartemen fagolisosom. Dengan lingkungan asam yang dinetralkan, sel T tidak merespon antigen (Harapan *et al.*, 2012).



Gambar 2.6. Respon Imun Adaptif pada Penyakit TB (Dheda et al., 2010)



Gambar 2.7. Respon Imun Alamiah Pada Penyakit TB (Dheda et al., 2010)

5. Produksi Sitokin *Mycobacterium tuberculosis*

Beberapa sitokin yang diproduksi oleh makrofag dan sel dendritik yang diaktifkan untuk stimulasi limfosit T. Makrofag dan sel dendritik menghasilkan sitokin tipe 1 : IL-12, IL-18, dan IL-23. Pada pasien dengan infeksi *Mikobakteri* nontuberkulosis berulang atau fatal, mutasi genetik fungsional telah ditemukan pada gen yang mengkode IL12p40, IL-12R 1, IFN-receptor 1, dan IFN-reseptor 2, yang semuanya terlibat dalam pensinyalan reseptor IFN di makrofag dan sel dendritik. Sel-sel ini akan bereaksi terhadap sitokin tipe Th1 yang diperlukan untuk stimulasi sel-T yang tepat. Selain itu, sitokin pro-inflamasi seperti IL-1 dan TNF- α memiliki sifat stimulasi sel-T. Penurunan produksi sitokin tipe 1 atau proinflamasi dapat menunda atau menurunkan stimulasi sel-T dan inisiasi imunitas sel-T yang spesifik antigen (Crevel, Ottenhoff and van der Meer, 2002).

IFN- γ adalah sitokin untuk respon imun protektif terhadap *Mycobacterium tuberculosis*. IFN- γ diproduksi terutama oleh CD4 +, Sel CD8 + T, dan sel NK, bersinergi dengan TNF- α dan makrofag untuk membunuh basil intraseluler. IFN- γ juga menambah antigen presentasi, mengarah ke perekrutan sel-T CD4 + dan / atau CD8 + sitotoksik Sel-T, yang berpartisipasi dalam pembunuhan *Mikobakteri*. Selanjutnya, IFN- γ menginduksi transkripsi lebih dari 200 gen di makrofag termasuk peningkatan regulasi ekspresi MHC kelas II dan produksi antimikroba (Hermayanti, 2012)

6. Gejala klinis dan faktor risiko

Gambaran Tuberkulosis paru termasuk batuk kronis, penurunan berat badan, demam, keringat malam, dan hemoptisis. Risiko berkembangnya penyakit Tuberkulosis aktif diatur oleh faktor eksogen dan endogen. Faktor eksogen menonjolkan perkembangan dari paparan infeksi. Faktor endogen menyebabkan perkembangan dari infeksi menjadi penyakit Tuberkulosis aktif. Malnutrisi, merokok dan polusi udara dalam ruangan padat merupakan faktor risiko terpenting kasus tuberkulosis di seluruh dunia, diikuti oleh infeksi HIV, diabetes dan konsumsi alkohol yang berlebihan. tuberkulosis ekstrapulmoner terjadi pada 10-42% pasien. Terjadinya penyakit paru tergantung pada usia, ada atau tidak adanya penyakit yang mendasari, latar belakang etnis, status kekebalan tubuh individu dan strain atau keturunan. Penyakit ini dapat terjadi di bagian tubuh mana pun dan dapat menyerupai banyak penyakit klinis. Koinfeksi HIV dengan tuberkulosis menghadirkan tantangan utama dalam diagnosis dan pengobatan tuberkulosis. Manifestasi tuberkulosis bervariasi tergantung pada status system kekebalan tubuh. Segera setelah infeksi HIV, presentasi tuberkulosis serupa dengan orang HIV seronegatif. Ketika jumlah CD4 turun, presentasi menjadi atipikal, dengan manifestasi paru atipikal dan sebagian besar pasien (lebih dari 50% dalam beberapa kasus) datang dengan penyakit ekstrapulmonal. Pada jumlah CD4 yang sangat rendah, gambaran penyakit paru mungkin sama sekali tidak ada dan

tuberkulosis yang menyebar dapat muncul sebagai penyakit demam nonspesifik dengan mortalitas tinggi (Ankrah *et al.*, 2016).

7. Tuberkulosis Laten

Tuberkulosis disebabkan oleh suatu bakteri (kuman) dan merupakan penyakit yang biasanya menyerang paru-paru tetapi juga dapat menyerang bagian lain tubuh, seperti otak, ginjal atau tulang punggung. Tuberkulosis bisa aktif dalam tubuh atau laten. Jika tidak dirawat, Tuberkulosis aktif dapat mengakibatkan masalah kesehatan yang serius, bahkan kematian (Subagyo, Ahmad., 2013).

Infeksi tuberkulosis laten adalah suatu keadaan seorang terinfeksi tuberkulosis namun tidak didapatkan bukti klinis maupun mikrobiologis sakit tuberkulosis. Diagnosis dan penatalaksanaan tuberkulosis laten merupakan salah satu tantangan pemberantasan tuberkulosis karena tidak ada bukti klinis dan mikrobiologis, namun pada populasi dengan tuberkulosis laten, 10% akan berkembang menjadi tuberkulosis aktif. Seseorang dengan tuberkulosis laten, risiko menjadi tuberkulosis lebih tinggi apabila terjadi perubahan secara klinis, epidemiologis atau gambaran radiologis. Satu-satunya metode yang digunakan secara luas untuk menilai infeksi tuberkulosis laten adalah uji tuberkulin atau sering dikenal sebagai mantoux test (Subagyo, Ahmad., 2013).

Tuberkulosis laten didefinisikan sebagai keadaan asimtomatik dengan karakteristik adanya respon sel T spesifik mikobakterium ditandai dengan

hasil uji tuberkulin positif, tidak ada manifestasi klinis tuberkulosis paru atau ekstra paru, dan tidak ada bukti sembuh dari sakit tuberkulosis. Hanya sebagian kecil individu yang penderita tuberkulosis laten yang mengalami perkembangan menjadi sakit tuberkulosis. Jumlah kuman pada tuberkulosis laten tidak cukup menyebabkan sakit tuberkulosis. Tuberkulosis laten mempunyai karakteristik dorman dan metabolisme kuman *Mycobacterium tuberculosis* bersifat inaktif (Panjaitan, 2014).

Tuberkulosis laten didefinisikan sebagai keadaan respon imun yang persisten terhadap stimulasi oleh antigen *Mycobacterium tuberculosis* tanpa bukti manifestasi klinis dari tuberkulosis aktif . Dalam populasi individu dengan tuberkulosis laten, kebanyakan kasus tetap asimtomatik dan tidak menular; namun, 5-10% dari mereka yang terinfeksi berkembang menjadi penyakit tuberkulosis aktif dan menjadi menular. Tuberkulosis laten adalah kontinum antara sembuh sendiri dan asimtomatik (Lu *et al.*, 2019) .

E. Diagnosis Tuberkulosis Paru

Dalam penegakan diagnosis tuberkulosis paru dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu: anamnesis pada pemeriksaan fisik, laboratorium darah rutin (LED, monosit, limfositosis), pemeriksaan sputum Basil tahan Asam (BTA), pemeriksaan kultur yang merupakan *gold* standar bagi diagnosis tuberkulosis, metode cepat uji resistensi obat (uji diagnostik molekuler cepat), *genXpert* assay, Uji tuberculin (mantoux test), *Polymerase chain reaction* (PCR) TB, Uji serologi: *Enzyme linked*

immunoabsorbent assay (ELISA), mycodot, peroksidase anti peroksidase (PAP) dan uji serologi yang baru (IgG TB dan uji ICT), *Becton Dickinson Diagnostic Instrument System* (BACTEC), pemeriksaan antigen lipoarabinomannan (LAM), ELISA *urinary antigen test* dan diagnosis tuberkulosis ditegakkan berdasarkan terdapat paling sedikit satu specimen konfirmasi *Mycobacterium tuberculosis* atau sesuai dengan gambaran histologi tuberkulosis atau bukti klinis dan radiologis sesuai tuberkulosis (Ndzi *et al.*, 2019)

Rangkaian pemeriksaan tersebut dan identifikasi mikroorganisme dalam secret atau jaringan pasien merupakan hal utama dalam mendiagnosis tuberkulosis, tetapi proses tersebut agak sulit dan mempunyai keterbatasan. Hasil pemeriksaan BTA (+) dari sputum memerlukan kurang lebih 5000 kuman/ml. Kuman (+) pada biakan dibutuhkan sekitar 50 – 100 kuman/ml an waktu pertumbuhan kurang lebih 4 – 8 minggu. Apabila terdapat gambaran infiltrate di lobus atas dan kaviti pada foto polos toraks, maka kemungkinan terjadinya tuberkulosis paru 80 – 85% (Palomino, 2007)

1. Pemeriksaan Mikroskopik

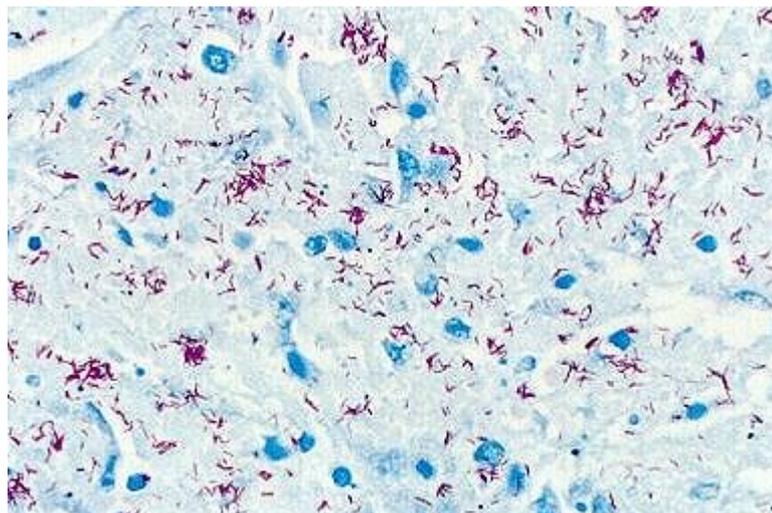
Diagnosis bakteriologis tuberkulosis yang paling umum berdasarkan pemeriksaan spesimen dahak (pemeriksaan BTA, isolasi kultur, metode molekuler, dll). Tergantung pada situs infeksi, spesimen lainnya termasuk berbagai cairan tubuh (pleura, serebrospinal, cairan sendi, dll), darah, kelenjar getah bening, dan spesimen biopsi lainnya. Pemeriksaan apusan

sputum untuk mendeteksi BTA adalah metode yang paling banyak digunakan untuk diagnosis tuberkulosis paru yakni dengan metode pewarnaan *Ziehl-Neelsen* dan diperiksa dengan mikroskop cahaya.

Spesies Mikobakterium dikelompokkan sebagai bakteri tahan asam karena membran selnya tidak dapat ditembus oleh zat pencelup dan pewarna. Meskipun demikian, sekali diwarnai, bakteri tahan asam akan menahan zat warna ketika dihangatkan dan diberi perlakuan dengan komponen asam organik. Beberapa cara pewarnaan yang digunakan pada pemeriksaan Mikobakteria (Todar, 2005) :

a. Pewarnaan Ziehl-Neelsen

Kuman difiksasi pada gelas alas, kemudian dituangkan karbol fuchsin. Lalu memanaskan sampai keluar uap selama 5 menit. Setelah itu cuci dengan air, lalu diberi alkohol asam 3% selama 5 menit. Bilas dengan air, lalu diberi metilen blue 0,5% selama 1-2 menit dan keringkan.



Gambar 2.8 *M. tuberculosis* pada pewarnaan ZN
(www.ihcworld.com/royellis/gallery/zn.htm)

b. Tan Thiam Hok (Kinyoun-Gabbett)

Kuman difiksasi pada gelas alas, kemudian diberi larutan Kinyoun selama 3 menit, lalu cuci dengan air. Kemudian larutan Gabbet selama 1 menit, cuci dengan air dan keringkan.

c. Auramin-Phenol Fluorochrome

Kuman difiksasi pada gelas alas, lalu diberi larutan Auramin phenol selama 10 menit, cuci dengan air. Kemudian dengan asam 42system42 1% selama 5 menit. Selanjutnya dengan KmnO_4 selama 10 detik, cuci dengan air dan keringkan.

Salah satu metode pewarnaan tahan asam untuk *Mycobacterium tuberculosis* adalah *Pewarnaan Ziehl-Neelsen*. Saat metode ini digunakan, smear *Mycobacterium tuberculosis* diatur dan diwarnai dengan carbol fuchsin, dan didekolorisasi dengan 42system42-asam. Kemudian diwarnai dengan *Metylen blue* atau pewarna lainnya, basil tahan asam muncul berwarna merah mudah yang kontras dengan latar belakang (Todar, 2005)

Sensitivitas dari metode ini terbatas: hasilnya bisa positif jika spesimen tidak kurang dari 10^4 BTA/ml dahak. Sensitivitas yang lebih tinggi, mungkin 10 kali lipat lebih besar dapat dicapai bila spesimen dahak terkonsentrasi (dekontaminasi) atau diperiksa dengan mikroskop fluorescent (misalnya, dengan auramine O).

Sensitivitas ZN dapat ditingkatkan dengan memberikan perlakuan berupa "Dekontaminasi Sputum" terhadap sputum yang diperiksa. Metode dekontaminasi adalah salah satu metode yang digunakan dalam diagnosis

tuberkulosis, namun metode ini masih sangat jarang digunakan di Indonesia. Bila didapatkan pada pemeriksaan dengan hasil BTA positif, barulah dapat dinyatakan, bahwa yang bersangkutan tersangka menderita tuberkulosis paru, dan masih diperlukan pemeriksaan lanjutan untuk menegaskan diagnosa yang tepat. Dekontaminasi sputum dilaksanakan dengan memberikan perlakuan kepada sputum berupa tiga macam zat kimia yaitu 4% NaOH, 2,9% Sodium Citrat dan N-Acetyl-L-Cystein. Hasil akhir setelah disentrifugasi dan supernatan dibuang, lalu endapannya yang mengandung BTA ditambahkan 1 ml NaCL steril. Sediaan inilah yang digunakan untuk pemeriksaan Zielh-Neelsen, Kultur dan PCR. Dengan demikian metode dekontaminasi sputum mengkonsentrasikan BTA dari sampel sputum yang diperiksa (Maidin, 2005).

Pembacaan hasil tes sediaan sputum yang dipakai sekarang adalah menggunakan skala (*International Union Against Tuberculosis and Lung Diseases* (IUATLD) :

- a) Tidak ditemukan BTA dalam 100 lapangan pandang, disebut 43system43e.
- b) Ditemukan 1 – 9 BTA dalam 100 lapangan pandang, ditulis jumlah bakteri yang ditemukan.
- c) Ditemukan 10 – 99 BTA dalam 100 lapangan pandang, disebut +/1+.
- d) Ditemukan 1 -10 BTA dalam 1 lapangan pandang, disebut ++/2+ dan minimal dibaca 50 lapangan pandang.

e) Ditemukan >10 BTA dalam 1 lapangan pandang, disebut +++/3+ dan minimal dibaca 20 lapangan pandang

Pasien dengan hasil tes positif dianggap paling menular, dan oleh karena itu, deteksi penderita ini dalam masyarakat merupakan salah satu prioritas yang ditetapkan oleh Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) untuk program TB. Menurut standar WHO, kasus TB defenitif didefinisikan sebagai "pasien yang memiliki hasil kultur positif terhadap *Mycobacterium tuberculosis*".

Menurut sebuah studi yang menggunakan metode epidemiologi molekuler, sebagian besar pasien BTA-negatif (kultur positif) merupakan sumber infeksi bagi 17% bagi keseluruhan kasus baru. Oleh karenanya WHO menganjurkan untuk mengembangkan metode diagnosis bakteriologis TB di luar pemeriksaan BTA (Palomino, 2005)

2. Pemeriksaan Metode Kultur

Pemeriksaan kultur bakteri tuberkel dari spesimen pasien dengan prosedur identifikasi adalah *gold standart* untuk diagnosis tuberkulosis. Kultur tidak hanya lebih sensitif dibandingkan pemeriksaan apusan, tetapi juga memungkinkan identifikasi spesies mikobakteria dan penentuan pola kepekaan obat. Hambatan utama penerapan kultur adalah kebutuhan tempat yang steril untuk kebutuhan dekontaminasi, biaya, kebutuhan untuk kondisi biosafety yang sesuai, dan teknologi modern yang mahal untuk mendeteksi cepat mikobakteri dengan kultur.

Pengolahan spesimen dengan metode kultur ini melibatkan prosedur yang menghasilkan aerosol seperti homogenisasi dan sentrifugasi. Oleh karena itu, isolasi kultur tidak disarankan pada laboratorium yang tidak memiliki *aerosol-contained centrifuges* dan peralatan yang aman dan perlengkapan lainnya. Selain lebih memberikan diagnosis lengkap dan akurat, isolasi kultur dan pemeriksaan selanjutnya yaitu pengujian kepekaan obat (DST) adalah penting untuk memberikan terapi yang sesuai.

3. Tes Tuberkulin

Uji kulit (*Mantoux*) merupakan salah satu jenis uji yang digunakan untuk mendiagnosa tuberkulosis laten dan untuk mengetahui orang yang terinfeksi dengan kuman tuberkulosis tetapi belum mengidap penyakit yang aktif. Uji ini merupakan metode standar untuk mendeteksi tuberkulosis laten, hasil uji tuberkulosis dikatakan positif apabila indurasi yang terbentuk >10 mm (Kambuno *et al.*, 2019)

Uji merupakan salah satu dasar kenyataan bahwa infeksi oleh *Mycobacterium* tuberkulosis akan menyebabkan reaksi *delayed-type hypersensitivity* terhadap komponen antigen yang berasal dari ekstrak *Mycobacterium* tuberkulosis atau tuberculin. Tuberkulin merupakan komponen protein kuman *Mycobacterium* tuberkulosis yang mempunyai sifat tuberkulosis yang kuat. Uji tuberkulosis merupakan alat diagnosis tuberkulosis yang sudah lama dikenal, tetapi hingga saat ini masih mempunyai nilai diagnostik yang tinggi. Uji ini dilakukan berdasar adanya

hipersensitivitas tubuh akibat adanya infeksi *Mycobacterium tuberculosis* terutama pada anak dengan sensitivitas dan spesifitas di atas 90% (Sidhi, 2010).

Reaksi uji tuberkulosis yang dilakukan secara intradermal akan menghasilkan hipersensitiviti tipe IV atau *delayed-type hypersensitivity* (DTH). Masuknya protein tuberkulosis saat injeksi akan menyebabkan sel T tersensitisasi dan menggerakkan limfosit ke tempat suntikan. Limfosit akan merangsang terbentuknya indurasi dan vasodilatasi, edema, deposit fibrin dan penarikan sel inflamasi ke tempat suntikan (Kenyorini, Suradi and Surjanto, 2006)

Reaksi tuberkulosis merupakan reaksi DTH. Protein tuberkulosis yang disuntikkan di kulit, kemudian diproses dan dipresentasikan ke sel Langerhans ke sel T melalui molekul MHC-II. Sitokin yang diproduksi oleh sel T, akan membentuk molekul adhesi endotel. Monosit keluar dari pembuluh darah dan masuk ke tempat suntikan yang berkembang menjadi makrofag. Produk sel T dan makrofag menimbulkan edema dan bengkak. Test kulit positif maka akan tampak edema atau tuberkulosis maksimal 48-72 jam setelah suntikan. Hasil uji tuberkulosis negatif dapat diartikan sebagai seseorang tersebut tidak terinfeksi dengan basil tuberculosi. Sedangkan Hasil uji tuberkulosis yang positif dapat diartikan sebagai seseorang tersebut sedang terinfeksi basil tuberkulosis. Jika hasil uji tuberkulosis positif maka harus dikonfirmasi dengan pemeriksaan foto toraks dan pemeriksaan dahak. Jika hasil foto toraks

tersebut normal maka dapat dilakukan pemberian terapi tuberkulosis laten, tetapi jika hasil foto toraks terjadi kelainan dan menunjukkan tuberkulosis maka dapat dimasukkan dalam tuberkulosis aktif (Kenyorini, Suradi and Surjanto, 2006)

Hasil uji tuberculin dapat dikaitkan dengan beberapa faktor di antaranya umur, jenis kelamin, status gizi, pekerjaan dan status merokok seseorang. Hasil uji tuberculin positif meningkat berdasarkan usia. Sedangkan pada penelitian sebelumnya di Afrika tahun 2003 didapatkan hasil uji tuberculin positif lebih tinggi pada laki-laki. Merokok dapat meningkatkan resiko terjadinya infeksi TB dan menyebabkan uji tuberculin menjadi positif, sedangkan untuk pekerjaan dan status gizi dan pekerjaan belum pernah dipakai sebagai faktor resiko untuk melihat hasil uji tuberculin (Kambuno *et al.*, 2019)

4. Tes Cepat Molekuler (TCM)

Tes Cepat Molekuler (TCM) GeneXpert merupakan pemeriksaan molekuler secara otomatis dan terintegrasi semua Langkah Polymerase Chain Reaction (PCR) berdasarkan uji deoxyribonucleic acid (DNA) untuk mendeteksi bakteri tuberkulosis dan sekaligus mendeteksi resistensi bakteri tersebut terhadap rifampisin. Pemeriksaan diklaim hanya memerlukan waktu 2 jam dengan *disposable cartridge* dari sampel dimasukkan kedalam mesin hingga hasil pemeriksaan keluar dan tercetak. Satu-satunya langkah manual adalah saat mencampur buffer

bakterisidal dengan sampel utama untuk ditambahkan ke cartridge (Blakemore *et al.*, 2010) (Novianti, Simarmata and Lolong, 2020).

Tes Cepat Molekuler yang WHO saat ini rekomendasikan hanyalah Xpert *MTB/RIF* assay. Pemeriksaan ini memberikan hasil dalam waktu 2 jam, dan awalnya (tahun 2010) direkomendasikan untuk diagnosis TB pada dewasa. Sejak tahun 2013, pemeriksaan ini juga direkomendasikan untuk anak-anak dan diagnosis spesifik TB ekstrapulmoner. Tes ini memiliki akurasi yang lebih baik dibanding pewarnaan sputum mikroskopik (WHO, 2019).

5. Pemeriksaan Interferon-Gamma Release Assay (IGRA)

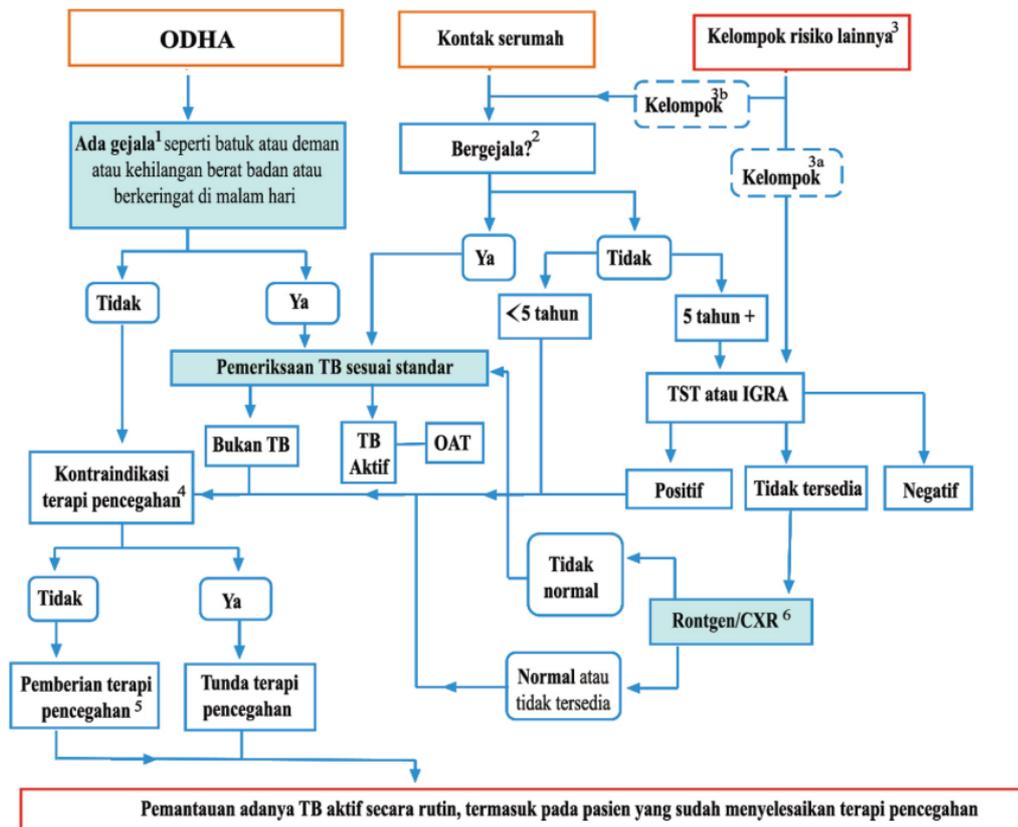
Pemeriksaan IGRA adalah uji *in vitro* berbasis darah lengkap yang digunakan untuk mengukur produksi interferon- γ (IFN- γ) sebagai respon spesifik terhadap antigen *Mycobacterium tuberculosis* secara *invitro* selama 16-24 jam. Dibanding *tes tuberculin*, IGRA lebih spesifik pada populasi yang tinggi angka vaksinasi BCG. Akan tetapi, *tes tuberculin* maupun IGRA tidak dapat digunakan untuk membedakan TB Laten dengan TB aktif (Mack *et al.*, 2009).

Prinsip IGRA adalah ketika sel T individu yang terinfeksi TB dirangsang kembali dengan antigen *Mycobacterium tuberculosis*, sel T melepaskan sitokin IFN- γ . IGRA positif menunjukkan adanya antibodi spesifik dalam tubuh pasien yang sistem kekebalannya telah terpapar TB, dan kadar IFN- γ spesifik *Mycobacterium tuberculosis* yang dihasilkan telah

mencapai ambang hasil IGRA positif (Menzies, Pai and Zwerling, 2008). Hasil positif dapat menunjukkan adanya bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, baik dalam status aktif maupun dorman (Lalvani and Pareek, 2010; Kim *et al.*, 2018).

Pemeriksaan IGRA digunakan untuk menyaring serta mendiagnosis TB laten sebagaimana yang ditunjukkan dalam algoritma pemeriksaan infeksi laten TB (Gambar 2.9), namun IGRA bukan satu-satunya metode yang digunakan untuk mengidentifikasi seseorang dengan TB laten (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2020; Zellweger *et al.*, 2020). Konfirmasi TB laten memerlukan pemeriksaan klinis serta foto rontgen dada yang bersih dari bercak TB (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2020). Metode lain yang dapat digunakan untuk mendeteksi latensi TB selain IGRA yaitu TST. Namun, IGRA dianggap memiliki nilai sensitivitas dan spesifisitas yang lebih tinggi (Trajman, Steffen and Menzies, 2013). Keunggulan IGRA dibanding TST yaitu dengan pemeriksaan IGRA, hasil positif palsu dapat dihindarkan pada individu yang sebelumnya telah divaksinasi BCG (Barcellini *et al.*, 2016). Selain itu, pemeriksaan IGRA dapat dilakukan cukup dengan satu kali kunjungan pasien, berbeda dengan TST yang membutuhkan dua kali kunjungan pasien, dimana kunjungan pertama untuk injeksi tuberkulin dan kunjungan kedua untuk interpretasi hasil setelah 48-72 jam injeksi tuberkulin. Dengan IGRA, risiko *loss to follow up* dalam proses skrining infeksi TB dapat diminimalisir (Linas *et al.*, 2011). Namun, pemeriksaan IGRA ini membutuhkan infrastruktur dan kapasitas

teknis laboratorium yang lebih besar, yang berarti lebih mahal dibandingkan TST (Kiazyk and Ball, 2017).



Gambar 2.9. Penggunaan IGRA dalam algoritma pemeriksaan infeksi TB laten dan terapi pencegahan TB pada Individu Berisiko (WHO, 2009)

Tes IGRA memiliki sensitifitas dan spesifitas lebih tinggi dibandingkan dengan tes tuberculin. Dua jenis pemeriksaan IGRA yang secara komersial sering digunakan yaitu ELISPOT (Enzyme Linkes Immunospot) dan Quantiferon_TB Gold In-Tube (QFT-GIT) berdasarkan prinsip ELIZA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Quantiferon_TB Gold In-Tube (QFT-GIT) adalah metode pemeriksaan secara tidak langsung yang merupakan pengembangan metode Quantiferon_TB Gold yang meT-GIT

sebesar 99 %, sedang ELISPOT 86 %. Tes QFT-GIT tidak menunjukkan reaksi silang dengan BCG, sehingga tes ini dapat digunakan pada individu dengan riwayat vaksinasi BCG (Lighter *et al.*, 2009)

Pemeriksaan IGRA dikembangkan berdasarkan kemajuan penelitian genomik mikobakteri yang mengidentifikasi segmen genom (*Region of Difference 1*) yang tidak ditemukan pada semua strain BCG dan sebagian besar mikobakteri lingkungan (kecuali *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*, *M. flavescens*, dan *M. gastrii*) (Lalvani and Pareek, 2010; Whitworth *et al.*, 2013). Dua antigen yang dikode oleh segmen ini, ESAT-6 dan CFP-10, merupakan target kuat sel T Th1 pada infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Kedua antigen mampu memperoleh respons sel T yang kuat dan spesifik mengurangi frekuensi hasil TST positif palsu pada individu yang sebelumnya telah menerima vaksinasi BCG (Barcellini *et al.*, 2016).

Interpretasi pemeriksaan IGRA terdiri dari positif, negatif, dan *indeterminate*. Hasil IGRA positif didefinisikan sebagai respons IFN- γ terhadap satu atau lebih antigen spesifik *Mycobacterium tuberculosis* di atas batas yang direkomendasikan, terlepas dari respons IFN- γ terhadap kontrol mitogen. Hasil IGRA negatif adalah respons IFN- γ di bawah batas untuk semua protein spesifik *Mycobacterium tuberculosis*, dengan respons terhadap kontrol mitogen di atas batas. Hasil *indeterminate* didefinisikan sebagai respons IFN- γ di bawah batas untuk kedua protein spesifik *Mycobacterium tuberculosis* dan kontrol mitogen, atau respons IFN- γ di atas batas dalam kontrol nihil (Banfield *et al.*, 2012).

Salah satu kit komersial pemeriksaan IGRA berbasis *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) yang banyak digunakan, yaitu QuantiFERON-TB Plus (QFT-Plus; Qiagen, Hilden, Jerman), merupakan generasi baru dari QFT-Gold in Tube (QFT-GIT), dengan tambahan tabung antigen (TB2). QFT-Plus terdiri dari empat buah tabung, yang terdiri dari Nil, TB1, TB2, dan Mitogen (Qiagen, 2019).

Tabung Nil merupakan tabung kontrol negatif, dimana tabung ini tidak mengandung tambahan antigen. Tabung Nil ini digunakan untuk menentukan apakah pasien memiliki respon imun yang sudah ada sebelumnya (seperti efek antibodi heterofil, dan produksi interferon gamma non-spesifik) yang dapat menyebabkan hasil positif palsu pada tes. Agar tes valid, tabung Nil harus memiliki nilai $\leq 8,0$ IU/mL (Qiagen, 2019).

Adapun tabung TB1 mengandung peptida turunan ESAT-6, dan CFP-10 (TB-7.7, yang sebelumnya ada pada QFT-GIT, tidak disertakan lagi pada QFT-Plus), dirancang untuk mengeluarkan respon imun yang dimediasi sel dari limfosit CD4⁺ T-*helper*. Sedangkan TB2 mengandung peptida tambahan yang mampu menstimulasi produksi IFN- γ oleh sel T CD8⁺ (Barcellini *et al.*, 2016; Qiagen, 2019). Dalam riwayat alami infeksi *Mycobacterium tuberculosis*, sel T CD4⁺ memainkan peran penting dalam kontrol imunologis melalui sekresi sitokin IFN- γ . Selain itu, sel T CD8⁺ juga berpartisipasi dalam pertahanan inang terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dengan memproduksi IFN- γ dan faktor terlarut lainnya, yang mengaktifkan makrofag untuk menekan pertumbuhan *Mycobacterium*

tuberculosis, membunuh sel yang terinfeksi, atau secara langsung melisis *Mycobacterium tuberculosis* intraseluler (Turner and Dockrell, 1996; Brookes *et al.*, 2003). Perbedaan dalam produksi IFN- γ antara dua tabung antigen (TB2-TB1) memberikan perkiraan respons CD8⁺ spesifik, dan dapat mengindikasikan infeksi TB baru-baru ini (Chee *et al.*, 2018). Respons sel T CD8⁺ dilaporkan meningkat pada subjek yang baru saja melakukan kontak dengan pasien TB, sedangkan respon sel T CD4⁺ tampaknya berkorelasi dengan TB aktif pada pasien yang diuji dengan QFT-GIT. Dengan demikian, respons sel T CD8⁺ mungkin lebih kuat pada permulaan infeksi (Nikolova *et al.*, 2012).

Tabung mitogen digunakan dalam uji QFT-Plus sebagai kontrol positif. Tabung kontrol mitogen berisi mitogen (phytohaemagglutinin-P), yang merupakan stimulator sel T non-spesifik. Tabung ini digunakan untuk memastikan pasien memiliki status kekebalan yang sehat dan juga berfungsi sebagai kontrol untuk penanganan dan inkubasi darah yang benar. Tabung mitogen digunakan untuk mendeteksi pembacaan negative palsu. Agar uji valid, tabung mitogen harus memiliki nilai interferon gamma 0,5 IU/mL lebih tinggi dari nilai tabung Nil. Hal ini menunjukkan bahwa kontrol mitogen, sebagai kontrol positif, berfungsi dengan baik (Qiagen, 2019).

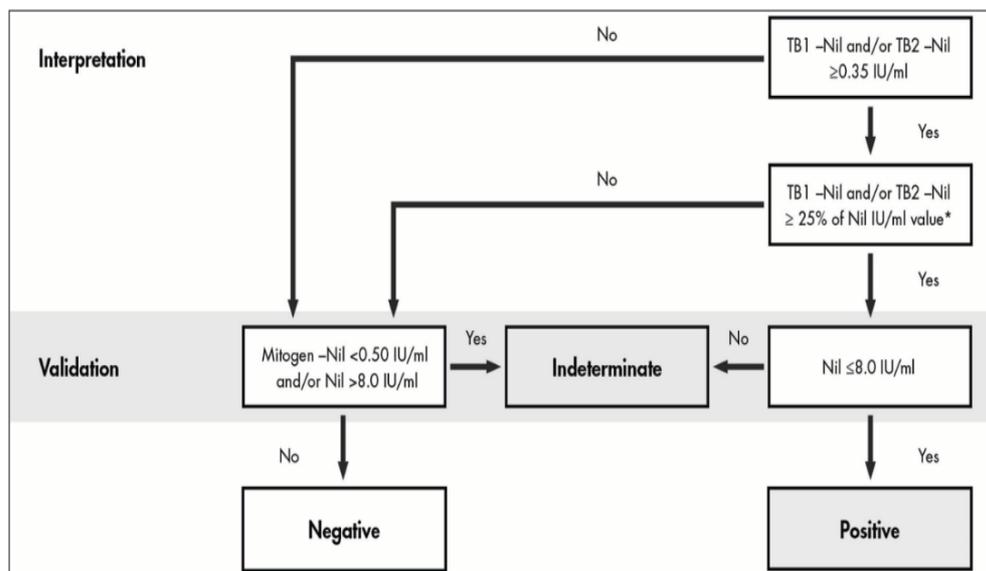
Uji QFT-Plus dianggap positif untuk respons IFN- γ terhadap salah satu tabung antigen TB yang secara signifikan di atas nilai Nil IFN- γ IU/ml. Sampel plasma dari tabung mitogen berfungsi sebagai kontrol positif IFN- γ

untuk setiap spesimen yang diuji. Respon yang rendah terhadap Mitogen (<0,5 IU/ml) menunjukkan hasil yang tidak pasti (*indeterminate*) ketika sampel darah juga memiliki respons negatif terhadap antigen TB. Pola ini dapat terjadi pada kondisi seperti kadar limfosit yang rendah, penurunan aktivitas limfosit karena penanganan spesimen yang tidak tepat, pengisian/pencampuran tabung Mitogen yang salah, atau ketidakmampuan limfosit pasien untuk menghasilkan IFN- γ . Peningkatan kadar IFN- γ dalam sampel Nil dapat terjadi dengan adanya antibodi heterofil, atau sekresi IFN- γ intrinsik. Tabung Nil menyesuaikan latar belakang (misalnya, peningkatan kadar IFN- γ dalam sirkulasi atau adanya antibodi heterofil). Kadar IFN- γ tabung Nil dikurangi dari kadar IFN- γ untuk tabung antigen TB dan tabung Mitogen (Qiagen, 2019).

Interpretasi hasil IGRA dengan menggunakan QFT-Plus ditunjukkan pada gambar 2.10. Respon terhadap kontrol positif Mitogen (dan kadang-kadang Antigen TB) dapat berada di luar jangkauan pembaca ELISA, namun hal ini tidak berdampak pada hasil tes. Nilai >10 ml dilaporkan oleh perangkat lunak QFT-Plus sebagai >10 IU/ml. ‡ Hasil indeterminate dapat disebabkan penyimpangan dalam proses ELISA, kadar IFN- γ dalam sirkulasi yang berlebihan atau adanya antibodi heterofil, atau masa inkubasi yang lebih dari 16 jam antara pengambilan spesimen darah dan inkubasi pada 37°C. Dalam studi klinis, kurang dari 0,25% subjek memiliki kadar IFN- γ >8,0 IU/ml untuk nilai Nil (Qiagen, 2019).

Nil (IU/ml)	TB1 minus Nil (IU/ml)	TB2 minus Nil (IU/ml)	Mitogen minus Nil (IU/ml)*	QFT-Plus Result	Report/Interpretation
≤8.0	≥0.35 and ≥ 25% of Nil value	Any	Any	Positive [†]	<i>M. tuberculosis</i> infection likely
	Any	≥0.35 and ≥ 25% of Nil value			
	<0.35 or ≥0.35 and <25% of Nil value	<0.35 or ≥0.35 and <25% of Nil value	≥0.5	Negative	<i>M. tuberculosis</i> infection NOT likely
	<0.35 or ≥0.35 and <25% of Nil value	<0.35 or ≥0.35 and <25% of Nil value	<0.5	Indeterminate [‡]	Likelihood of <i>M. tuberculosis</i> infection cannot be determined
>8.0 [§]	Any				

Gambar 2.10. Interpretasi hasil IGRA dengan menggunakan QFT-Plus (Qiagen, 2016).



Gambar 2.11. Diagram alur interpretasi hasil IGRA dengan menggunakan QFT-Plus

*Untuk validitas TB1 minus Nil atau TB2 minus Nil, jumlah 25% dari nilai Nil IU/ml harus dari tabung yang sama dengan hasil asli 0,35 IU/ml (Qiagen, 2016).

Besarnya tingkat IFN- γ yang diukur tidak dapat dikorelasikan dengan stadium atau derajat infeksi, tingkat respons imun, atau kemungkinan berkembang menjadi penyakit aktif. Respon TB positif pada orang yang negatif terhadap mitogen jarang terjadi, tetapi telah terlihat pada pasien dengan penyakit TB. Hal ini menunjukkan respon IFN- γ terhadap antigen TB lebih besar dibandingkan dengan mitogen, hal ini dimungkinkan karena kadar mitogen tidak secara maksimal merangsang produksi IFN- γ oleh limfosit (Qiagen, 2019).

Hasil *indeterminate* mungkin dapat disebabkan karena adanya masalah dalam proses pengerjaan ELISA, seperti perubahan warna nonspesifik,

pembacaan densitas optik yang rendah pada standar, dan kurva standar non-linear. Perubahan warna nonspesifik dapat disebabkan oleh proses pencucian *plate* yang tidak sempurna, kontaminasi silang sumur ELISA, kit / komponen telah kedaluwarsa, larutan substrat enzim terkontaminasi, dan pencampuran plasma dalam tabung QFT-Plus sebelum panen. Pembacaan densitas *57yste* yang rendah pada standar, dapat disebabkan karena kesalahan teknis saat dilusi standar, pipetting, temperatur inkubasi saat ELISA terlalu rendah, waktu inkubasi yang terlalu singkat, panjang gelombang saat pembacaan ELISA yang tidak sesuai, dan suhu reagen yang rendah ketika digunakan (belum mencapai suhu ruangan). Adapun kurva standar yang tidak linear dapat disebabkan oleh proses pencucian yang tidak sempurna, masalah pipetting, atau kesalahan dalam dilusi reagen standar. Selain masalah teknis, hasil *indeterminate* juga dapat disebabkan tingginya kadar IFN- γ dalam sirkulasi atau adanya antibodi heterofil, atau masa inkubasi yang lebih dari 16 jam antara pengambilan spesimen darah dan inkubasi pada 37°C. Selain itu, hasil *indeterminate* dengan respon yang rendah terhadap Mitogen (<0,5 IU/ml) dan respons negatif terhadap antigen TB dapat ditemukan pada keadaan dimana limfosit tidak mampu menghasilkan kadar IFN- γ , sebagaimana yang dijelaskan sebelumnya (Qiagen, 2019).

Sebuah studi yang mengevaluasi IGRA (di daerah dengan insiden TB rendah pada kontak TB dan imigran baru dari negara-negara dengan insiden tinggi) menunjukkan nilai prediksi positif dari IGRA cukup tinggi,

bahkan mencapai 99%. Namun, nilai prediksi positif IGRA hanya 3-4% (Abubakar *et al.*, 2018). Dengan demikian, hasil IGRA negatif dapat diandalkan dalam memprediksi tidak berkembangnya TB aktif, tetapi hanya 3-4% dari individu dengan hasil IGRA positif dapat berkembang menjadi TB. Dengan kata lain, jumlah orang yang terpajan TB dengan IGRA-positif yang perlu diobati untuk mencegah satu kasus TB adalah sebesar 25-33 orang, dengan asumsi kepatuhan dan efektivitas terapi pencegahan sebesar 100% (Lalvani, Berrocal-Almanza and Halliday, 2019).

F. Tinjauan Umum tentang *micro-RNA*

1. Definisi *micro-RNA*

Mekanisme epigenetik yang lain adalah *micro-RNA* atau disingkat miRNA, yaitu golongan asam ribonukleat (RNA) non-koding single stranded berukuran kecil (dengan panjang antara 19-25 nukleotida) yang berfungsi dalam regulasi ekspresi gen dengan menghambat peran (men-downregulasi) gen sasarannya pada tahap pasca transkripsi dari ekspresi gen. Mengenai microRNA ini pertama kali ditemukan pada tahun 1993, dan istilah miRNA digunakan pertama kali pada tahun 2001, dan sejak saat itu penelitian mengenai miRNA ini telah berhasil menemukan beberapa set miRNA yang diekspresikan oleh berbagai sel dan jaringan yang berbeda.

Pada hewan, mekanisme penghambatan (supresi) terjadi tanpa degradasi, sementara pada tumbuhan miRNA akan menempel pada

mRNA, sehingga terjadi double stranded RNA, yang merupakan substrat bagi enzim-enzim peredam (silencer).

miRNA ini ditranskrip dari DNA namun tidak diproses menjadi protein atau polinukleotid, sehingga dikatakan dihasilkan oleh bagian non-koding dari DNA. Bagian DNA ini dikenal sebagai faktor transkripsi (transcription factor), karena mengganggu proses transkripsi. miRNA dapat ditemukan di daerah di antara gen (intergenik) ataupun di dalam intron dari gen (intergenik). miRNA ini ditranskripsikan sebagai molekul tunggal atau dalam kelompok.

Proses yang melibatkan miRNA sekarang diketahui mencakup berbagai bidang yang luas, termasuk di dalamnya perkembangan, pengisyratan (signaling) hormon, pemeliharaan homeostatis, dan tanggapan isyarat lingkungan dan nutrisi.

MicroRNA adalah kelas RNA non-coding yang memainkan peran penting dalam mengatur ekspresi gen, dengan rata-rata Panjang nukleotida yaitu 22. Kebanyakan miRNA ditranskripsi dari DNA urutan menjadi miRNA primer (pri-miRNA) dan di proses menjadi miRNA prekursor (pra-miRNA) dan miRNA dewasa. Pada kebanyakan kasus, miRNA berinteraksi dengan 3' wilayah yang tidak diterjemahkan (3' UTR) dari miRNA target untuk menginduksi degradasi miRNA dan represi translasi. miRNA telah terbukti mengaktifkan ekspresi gen di bawah kondisi tertentu. Studi terbaru menunjukkan bahwa miRNA adalah kebalikan antara kompartemen

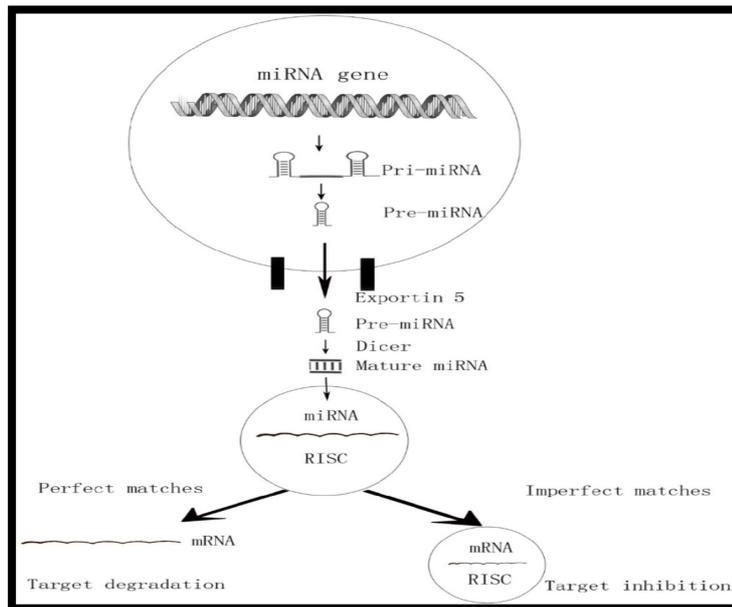
subseluler yang berbeda untuk dikembangkan pada tingkat terjemahan dan bahkan pada proses transkripsinya (O'Brien *et al.*, 2018).

miRNA sangat penting dan juga terlibat dalam berbagai proses biologis. Selain itu, ekspresi miRNAs dikaitkan dengan banyaknya penyakit pada manusia dan miRNA disekresikan menjadi cairan ekstraseluler. miRNA ekstraseluler telah banyak dilaporkan sebagai biomarker potensial untuk berbagai penyakit dan juga berfungsi sebagai molekul pemberi sinyal untuk menengahi komunikasi sel yang berlangsung (O'Brien *et al.*, 2018).

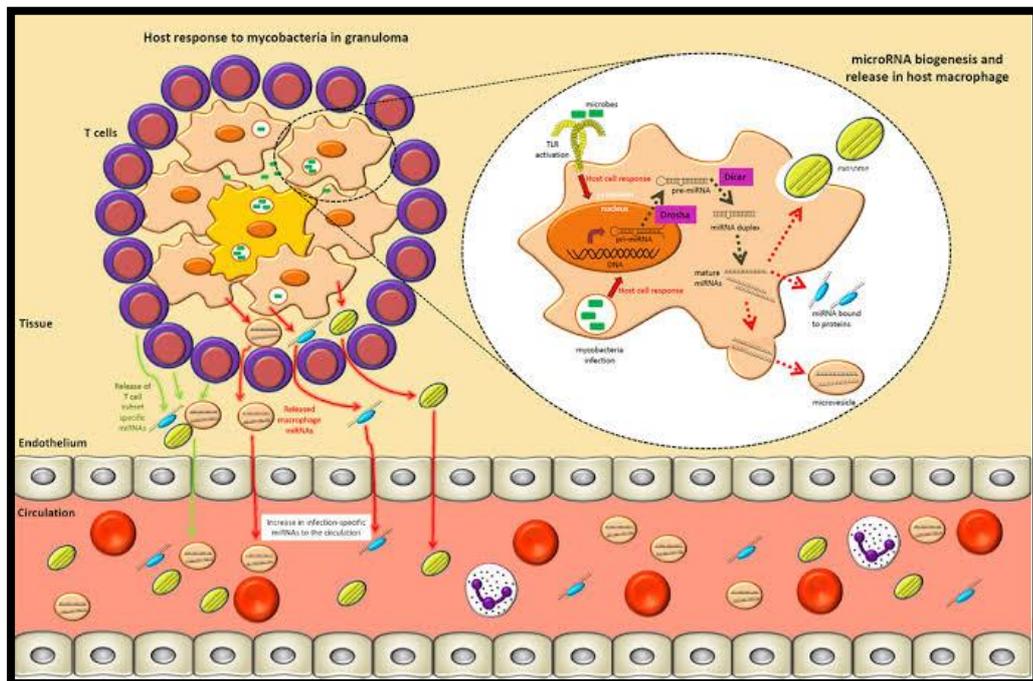
2. Biogenesis micro-RNA

miRNA diproduksi dari gennya sendiri atau dari intron. Kebanyakan miRNA adalah intergenik atau dari bagian anti-sense terhadap gen disebelahnya dan ditranskripsikan sebagai unit yang independen. Namun, pada keadaan lain, gen miRNA ditranskripsikan bersama dengan gen hostnya. Lebih kurang 40 % dari gen miRNA terdapat pada intron dan protein dan gen koding non-protein atau bahkan pada ekson dari transkripsi koding-nonprotein.

Gen miRNA ditranskripsikan oleh RNA polymerase II (Pol II). Polymerase biasanya berikatan dengan adanya promotor yang berada di dekat sekuensi DNA yang mengkode apa yang akan menjadi pre-miRNA. Hasil transkripsinya akan diapit (capped) oleh suatu nukleotida pada bagian 5' end, polyadenylated oleh adenosin multiple (poly (A) tail), dan akan diurai (spliced).



Gambar 2. 12. Biogenesis microRNA



Gambar 2.13. Granuloma TB Paru menunjukkan bagaimana sirkulasi mikroRNA spesifik (miRNA) dapat muncul selama proses infeksi.

Biogenesis miRNA dimulai dengan pemrosesan RNA polymerase Transkrip II /III post atau co-transcriptionally . Sekitar setengah dari semua miRNA yang teridentifikasi bersifat intergenik, kemudian ditranskripsikan secara independen dari gen inang dan di atur oleh gen promotor mereka sendiri (O'Brien *et al.*, 2018).

Proses biogenesis mulai dari gen yang mengkode primary miRNA (pri-miRNA) ditranskripsikan didalam nucleus, dan diproses oleh suatu *enzim* *Dorsha* menjadi precursor miRNA (pre-miRNA) dan dipindahkan ke sitoplasma dan akan lebih lanjut diproses oleh *Dicer* untuk memisahkan untai ganda (double stranded menjadi single stranded). Setelah untai terpisah, miRNA yang matang akan menekan produksi protein dengan cara memblok translasi atau menyebabkan degradasi transkripsi pada targetnya yaitu micro RNA ribonucleoprotein complex (miRNP) atau sering disebut juga dengan RNA-induced silencing complex (RISC). Bersamaan dengan itu, limfosit T di sekitarnya yang terlibat dalam pembentukan / pemeliharaan granuloma akan meningkatkan regulasi miRNA subset spesifik sel T sebagai cara memodulasi jenis respons imun adaptif. miRNA matang yang dihasilkan dalam makrofag dan sel T juga dapat dilepaskan ke lingkungan ekstraseluler dalam eksosom, mikrovesikel heterogen, atau dalam hubungan dengan lipoprotein densitas tinggi, LDL, atau kompleks protein lainnya. Selanjutnya, miRNA ekstraseluler ini berpindah dari tempat infeksi lokal ke sistem sirkulasi. Oleh karena itu, proses ini dapat menimbulkan ekspresi miRNA bersirkulasi spesifik pada infeksi yang dapat dengan

mudah diakses dari berbagai cairan biologis (misalnya : serum, plasma, atau dahak).

Pada dasarnya, miRNA yang dihasilkan di dalam nukleus dan selanjutnya akan dibawa ke sitoplasma, miRNA ini akan berikatan dengan messenger-RNA (mRNA) yang membawa pesan atau kode genetic dimana mRNA ini awalnya akan mentranslasikan (menghasilkan) suatu protein, namun karena berikatan dengan miRNA yang komplementari dengannya, maka mRNA tadi tidak dapat menghasilkan protein tersebut.

3. Peran micro-RNA sebagai Regulator Gen

micro-RNA merupakan regulator post-transkripsi yang dapat ditemukan di jaringan dan sirkulasi darah. *MiRNA* berperan sebagai regulator ekspresi gen melalui targetnya pada *mRNA* dengan menekan translasi atau degradasi *mRNA*. Agar dapat berfungsi, *miRNA* harus diekspresikan dengan targetnya yaitu *mRNA*. Satu *miRNA* dapat meregulasi beberapa *mRNA*, dan satu *mRNA* dapat menjadi target beberapa *miRNA* yang berbeda-beda. *MiRNA* memiliki banyak target *mRNA* sehingga mempengaruhi ratusan ekspresi protein. *MiRNA* terlibat di berbagai proses selular yaitu perkembangan, proliferasi sel, diferensiasi sel, apoptosis, dan respon terhadap stress (Calin and Croce, 2006)

4. Peran *micro-RNA* pada Penyakit Tuberculosis

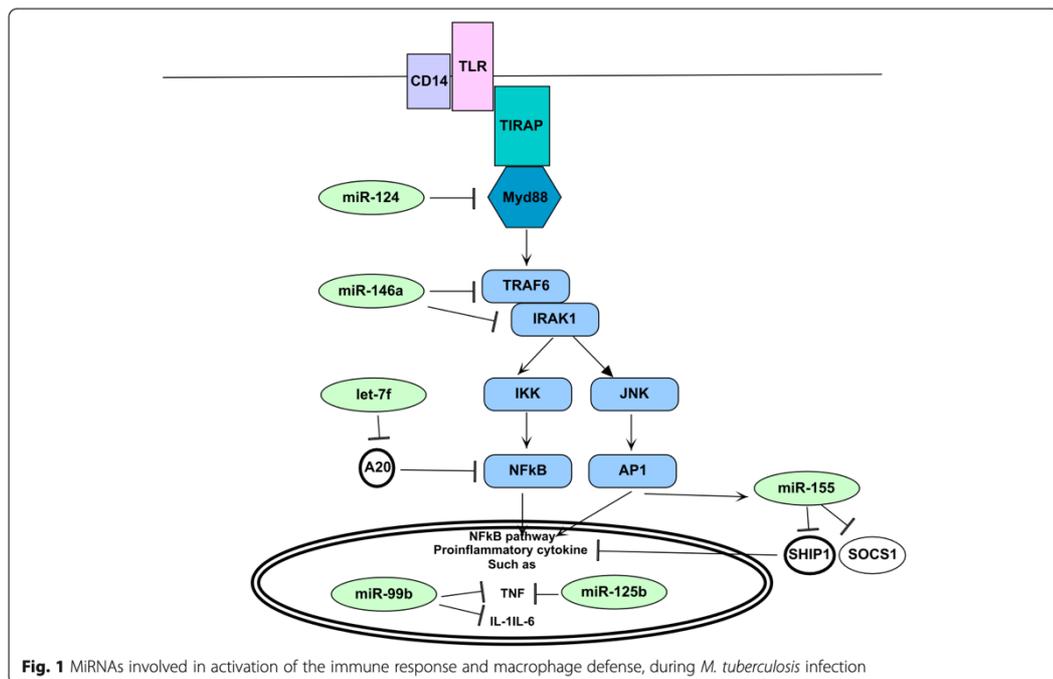
Mycobacterium tuberculosis merupakan organisme yang telah terkoordinasi dengan sel inang, sehingga telah beradaptasi dengan

makrofag pada sel inang untuk bertahan hidup. Sampai saat ini, sedikit yang diketahui tentang bagaimana respon imun makrofag berubah selama infeksi tuberkulosis oleh miRNA pejamu, yang merupakan respon imun pertama pada paru-paru sebagai fagosit terhadap *M. tuberculosis*. Untuk memastikan kelangsungan hidup dan proliferasi, bakteri pathogen memanipulasi berbagai jalur dan fungsi seluler inang. Regulasi ekspresi miRNA oleh infeksi akibat bakteri patogen, segera setelah infeksi terjadi, merupakan bagian penting dari respons inang terhadap infeksi, serta strategi molekuler untuk mengatur jalur sel inang oleh bakteri. Sedangkan makrofag adalah sel target untuk infeksi *Mycobacterium* tetapi tidak terpengaruh oleh miRNA, selama infeksi. Titik kritis dari respon imun bawaan dan adaptif adalah sel dendritik yang dapat mengaktifkan dan mempolarisasi respon sel T topikal, diatur oleh miRNA. miRNA memainkan peran penting dalam mengatur fungsi utama makrofag, sel dendritik, dan Sel NK (Behrouzi *et al.*, 2019).

Salah satu aspek penting untuk mengendalikan penyebaran penyakit Tuberkulosis(TB) adalah dengan mendiagnosisnya secara dini. Namun, sistem pengujian yang umum digunakan masih kurang. Selain itu, pengujian saat ini belum baik kinerjanya dalam membedakan antara TB aktif dan infeksi tuberkulosis laten. Karena pengetahuan yang terbatas untuk biomarker TB dinilai menarik untuk diikuti. *miRNA* adalah regulator penting pasca transkripsi terbukti terlibat dalam modulasi respon imun melawan patogen intraseluler. Temuan ini membuka

kemungkinan menggunakan *miRNA* sebagai penanda biologis TB untuk diagnosis (Latorre *et al.*, 2015).

Banyak penelitian menunjukkan perubahan ekspresi gen dalam makrofag dan sel NK, karena TB aktif dan TB laten dibandingkan individu sehat. *miRNA* mengatur perubahan ekspresi gen dan variasi komposisi seluler. Beberapa *miRNA* mengatur diferensiasi sel T dan fungsinya. Bin dkk. menunjukkan bahwa jalur aktivasi makrofag intrinsik dapat mengubah regulasi, melalui beberapa *miRNA* (Gambar 2.14).



Gambar 2.14. miRNA yang terlibat dalam Aktivasi Respon Imun dan Pertahanan Makrofag Selama Infeksi *Mycobacterium tuberculosis* (Behrouzi *et al.*, 2019)

Pada Gambar 2.14 menunjukkan bahwa *M. tuberculosis* memodifikasi miR-26a, miR132 dan miRNA lainnya pada sel inang, melemahkan respons imun untuk memastikan kelangsungan hidup. Selain

itu, juga menunjukkan bahwa miR-132 dan miR-29a biasanya bertindak sebagai regulator negatif untuk fungsi makrofag melalui *Interferon gamma*. Dalam kasus TB paru, induksi kedua miRNA ini pada makrofag alveolar membatasi respon imun dan mendegenerasi ruang alveolar. Di sisi lain, penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa miR-361-5p relatif mirip dengan jumlah fibrosis yang diinduksi bleomisin pada paru-paru tikus, dan mungkin terlibat dalam memahami mekanisme cedera paru dan fibrosis. Yuhua dkk. menunjukkan untuk pertama kalinya bahwa kadar miR-361 yang tinggi diekspresikan dalam serum pasien TB, dibandingkan dengan orang sehat, dan dapat dispekulasikan bahwa hal ini mencerminkan akibat adanya infeksi TB, walaupun mekanisme yang terkait belum jelas (Tabel 2.1)

Tabel 2.1 MiRNA dan Efek Regulasi yang terlibat pada Infeksi *Mycobacterium tuberculosis* (Behrouzi et al., 2019)

miRNAs	Peran miRNA
MiR-29	Menghambat IFN- γ
MiR-21	Menurunkan ekspresi IL-1B, Menghambat IL-12P3, meningkatkan inhibisi sitokin IL-10
MiR-99b	Target transkrip TNF- α mRNA dan produksi TNF- α
MiR-125	Target transkrip TNF- α mRNA, Mengurangi respon inflamasi
MiR-155	Target transkrip TNF- α mRNA , Menghambat IFN- γ
MiR-144	Menghambat IFN- γ dan TNF- α

MiR-223	Menghambat IL-6
MiR-26a	Induksi polarisasi anti inflamasi

Penelitian yang dilakukan oleh Eur Espir (2015) menggunakan sampel darah yang dikumpulkan dari lima lembaga berbeda yang berlokasi di Barcelona. Dari 50 orang diklasifikasikan menjadi 3 kelompok 1). 17 individu TB laten. Mereka telah masuk dengan kondisi telah terpapar pasien TB paru BTA Positif atau negatif. 2). 17 pasien TB aktif dengan BTA positif *Mycobacterium Tuberculosis* dan tidak lebih 2 minggu terapi anti TB. 3). 16 individu sehat dengan TST negatif dari hasil uji IFN- γ negatif. Untuk mengidentifikasi miRNA yang diekspresikan secara berbeda antara tiga kelompok studi, sampel darah adalah yang pertama di analisis dengan microarray. MiRNA yang diregulasi berbeda pada individu TB dan LTBI aktif sehubungan dengan kontrol yang sehat (TB versus HC dan LTBI versus HC).

Sembilan *miRNA* yang diekspresikan secara berbeda dianalisis lebih lanjut dengan RT-qPCR. Tiga miRNA diregulasi secara signifikan pada pasien TB aktif dengan TB laten dan kontrol yang sehat. Sampel darah diidentifikasi dengan microarray dengan mendeteksi perbedaan ekspresi hasilnya tampak cukup rendah sehingga kebutuhan untuk validasi menggunakan RT-qPCR dari hasil microarray. Hasil yang didapatkan adalah miRNA baru yang diturunkan dari darah utuh memungkinkan diagnosis cepat TB dengan sensitivitas 91,21% dan spesifitas 87,95% studi

kohort yang lebih besar diperlukan untuk memvalidasi pada kasus TB luar paru (Latorre *et al.*, 2015).

Metode penting untuk mengendalikan penyebaran TB secara efektif adalah untuk mendiagnosisnya pada tahap awal. Sistem pengujian yang saat ini digunakan tidak cukup dan dalam praktiknya tidak dapat membedakan antara keduanya TB aktif dan infeksi TB laten. Profil ekspresi miRNA dapat membantu membedakan antara TB aktif dan LTBI dan juga dapat bertindak sebagai penanda biologis yang handal untuk diagnosis penyakit. Potensi miRNA telah menerima banyak perhatian dalam beberapa tahun terakhir, dengan beberapa studi baik secara *in vivo* dan *in vitro* mengusulkan miRNA sebagai biomarker potensial dapat digunakan sebagai cara baru untuk membedakan antara tuberkulosis aktif, tuberkulosis laten dan individu sehat (Tabel 1) (Sabir *et al.*, 2018).

Tabel 2.2. Perbedaan ekspresi miRNA pada Tuberkulosis dan Potensinya sebagai Biomarker

Species examined	Type of tissue/cells examined	Candidate biomarkers	Reference
Human	PBMCs	has-miR-21 and has-miR-26b	Xu et al., 2013
Human	Macrophages	miR-125b and miR-155	Rajaram et al., 2011
Human	Macrophages	miR-29a and miR-361-5p	Draz et al., 2014
Human	Macrophages	miR-31	Wang et al., 2015
Human	Serum	miR-4433b-5p, miR-424-5p, and miR-199b-5p	Wang et al., 2016
Human	Whole Blood	hsa-miR-21 hsa-miR-7f-1	Latorre et al., 2015
Human	Serum	miR-361-5p, miR-889, and miR-576-3p	Qi et al., 2012

Human	Whole blood	miR-1, miR-155, miR-31, miR-146a, miR-10a, miR-125b, miR-150, and miR-29a	Zhou et al., 2016
Human	Macrophages	miR-144	Liu et al., 2016
Human	Serum	hsa-let-7b and hsa-miR-30b	Xin et al., 2016
Human	Macrophages	let-7e, miR-29a , and miR-886-5p	Sharbati et al., 2011
Human	Macrophages	miR-3179, miR-147, and miR-19b-2_	Yi et al., 2012
Human	Macrophages	miR-155, miR-146a, miR-145, miR-222_, miR-27a, and miR-27b	Furci et al., 2013
Human	Serum	miR-424-5p, miR-493-5p, miR-296-5p, miR-27b-3p, miR-377-5p, miR-3680-5p, and miR-191-5p	Meng et al., 2014
Human	T cells	miR-144	Liu et al., 2011
Human	Whole blood	miR-424 and miR-365	Wang et al., 2011
Human	Serum	miR-93, miR-29a	Fu et al., 2011
Human	Dendritik cells	miR-99b	Singh et al., 2012

Beberapa studi mengungkapkan profil ekspresi gen yang berubah pada makrofag dan sel NK dari tuberkulosis aktif dan laten serta kontrol yang sehat. Perubahan komposisi seluler dan ekspresi gen terkait pada pasien tuberkulosis kemungkinan diatur oleh miRNA. Beberapa miRNA telah ditemukan untuk mengatur diferensiasi dan fungsi sel T. Selain itu, miRNA terbukti penting dalam mengatur fungsi imun bawaan yaitu makrofag, sel DC dan NK (Harapan *et al.*, 2012).

miRNA memainkan sebuah peran penting dalam mengatur fungsi utama makrofag, sel dendritik, dan Natural Killer Cells (NKC). Banyak

penelitian menunjukkan adanya perubahan ekspresi gen pada makrofag dan sel NK pada TB aktif, TB latent dan juga pada individu yang sehat. miRNA mengatur perubahan ekspresi gen, miRNA mengatur diferensiasi sel T dan fungsinya (Bezman *et al.*, 2010)

G. Tinjauan tentang *miRNA-99b-5p* pada Tuberkulosis

Paparan *Mycobacterium tuberculosis* menyebabkan ekspresi miR-99b-5p berlebih. Analisis lebih lanjut menemukan pemblokiran miR-99b-5p (dengan antagomir dan pendekatan knockdown) menghasilkan pengurangan pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* yang signifikan dan peningkatan sitokin proinflamasi secara signifikan seperti TNF- α , IL-6, IL-12, dan IL-1 β . Inhibisi pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* mungkin disebabkan oleh peningkatan produksi sitokin proinflamasi tersebut. Selain itu, penelitian sebelumnya menemukan bahwa *miR-99b-5p* secara langsung menargetkan *Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily-4* (TNFRSF-4) dan TNF- α mRNA, untuk mengatur ekspresi berbagai sitokin dan faktor transkripsi yang terlibat dalam jalur diferensiasi sel T dan *Mycobacterium tuberculosis*. Selain itu, anti-miR-99b-transfected pada sel dendritik dengan antibodi anti-TNF- α mengakibatkan peningkatan kematian bakteri. Hal ini menegaskan bahwa *miR-99b-5p* memiliki peran penting terhadap pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* pada sel dendritik dengan menghambat produksi TNF- α , yang memungkinkan bakteri untuk menghindari respon

imun pada host dan bertahan hidup dalam fagosit host (Singh *et al.*, 2013).

H. Tinjauan tentang *miRNA-29a-3p* pada Tuberkulosis

miR-29a-3p diekspresikan secara berlebihan setelah infeksi *Mycobacterium* pada sel host. miR-29a-3p menekan respons imun terhadap *M. tuberculosis* dengan menurunkan IFN- γ . Selain penargetan 3' UTR IFN- γ mRNA, miR-29a mempromosikan IFN- γ mRNA dengan protein Argonaute 2 (Ago2) untuk membentuk *silencing complex RNA* dan kemudian menekan ekspresi IFN- γ pada pasca transkripsi. Selain itu, beberapa penelitian menunjukkan bahwa miR-29a-3p juga menargetkan protein anti apoptosis limfoma sel B 2 (Bcl-2) dan leukemia sel myeloid-1 (Mcl-1), kinase p85 α dan protein pengikat GTP Cdc42, sehingga menunjukkan peran *miR-29a-3p* dalam mengatur jalur apoptosis. miR-29 yang diekspresikan secara berlebihan pada infeksi tuberkulosis dan menghindari fagositosis makrofag melalui penghambatan IFN- γ dan peningkatan apoptosis sel melibatkan respons anti-tuberkulosis (Fu *et al.*, 2011)

miR-29a-3p, yang awalnya ditemukan sebagai penekan mRNA pada infeksi virus yang secara khusus menargetkan wilayah HIV-1 3'UTR, telah dilaporkan mengalami penurunan regulasi dalam sel NK selama infeksi sistemik akibat infeksi *Listeria monocytogenes* atau *Mycobacterium bovis*, hal ini menyebabkan depresi Interferon- γ sebagai targetnya. Jalur yang dimediasi oleh miR-29a-3p meningkatkan

resistensi inang terhadap infeksi *Listeria*. Sebaliknya, miR-29a-3p ditemukan diregulasi dalam serum dan sputum pasien dengan tuberkulosis paru aktif dibandingkan dengan kontrol yang sehat (Fu *et al.*, 2011). Mir-29a, bersama dengan miR-let-7e, juga diinduksi dalam makrofag manusia pada infeksi *Mycobacterium avium* di mana targetnya adalah caspase 7 dan 3, di jalur apoptosis. Dengan cara ini, penghambatan apoptosis pada infeksi *Mycobacteria* dikendalikan oleh miRNAs (Sharbati *et al.*, 2011).

I. Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) pada Tuberkulosis

1. Definisi Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α)

TNF- α adalah sitokin yang diproduksi terutama oleh monosit/ makrofag, tetapi juga dapat diproduksi oleh banyak sel lain, termasuk sel mast, sel endotel, jaringan saraf, dan sel limfoid seperti limfosit T dan B, dan sel pembunuh alami (NK) . TNF- α sebagai faktor larut dan transmembran. Namun, sitokin terutama diproduksi sebagai protein transmembran dari 212 asam amino, tersusun dalam homotrimer yang stabil (Mootoo *et al.*, 2009)

2. Peran TNF- α pada Infeksi *Mycobacterium tuberculosis*

Respon imun protektif terhadap *Mycobacterium tuberculosis* lebih dominan tergantung pada sel T dan ditandai dengan radang granulomatous, yang melibatkan keberadaan makrofag, limfosit dan fibroblas. Formasi granuloma adalah mekanisme pertahanan oleh tubuh, melawan bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Pada pasien TB, Th1 sitokin diproduksi pada tingkat tinggi di tempat infeksi, tetapi ada bukti bahwa pada

tingkat sistemik justru mungkin sebaliknya, dan tingkat sitokin Th2 di sistemik meningkat. Sitokin Th1 IFN- γ , IL-2 dan IL-12 mempromosikan imunitas yang dimediasi sel, yang sangat penting untuk kontrol dari infeksi mikobakteri. IL-12 disekresi oleh Dendritik Cell dan makrofag yang terinfeksi mendorong diferensiasi sel Th 0 menuju fenotip Th1, dengan sekresi IFN sebagai hasil utama. IFN memainkan peran penting dalam mengendalikan infeksi Mycobacterial, walaupun dengan informasi progresif produksi IFN sendiri tidak cukup untuk menghilangkan infeksi. Namun, ada peningkatan dalam produksi sitokin Th2, IL4 dan IL-5, serta sitokin pengatur IL-10. Sitokin ini mempromosikan respon imun humoral, dan dapat melemahkan atau menghambat respon mediator Th1 pelindung untuk infeksi mikobakteri. Selain itu, mononuclear sel mensekresi faktor autokrin TNF- dan TGF-, dengan efek yang kontras pada aktivitas bakterisida dari sel-sel ini (Lestari, 2021)

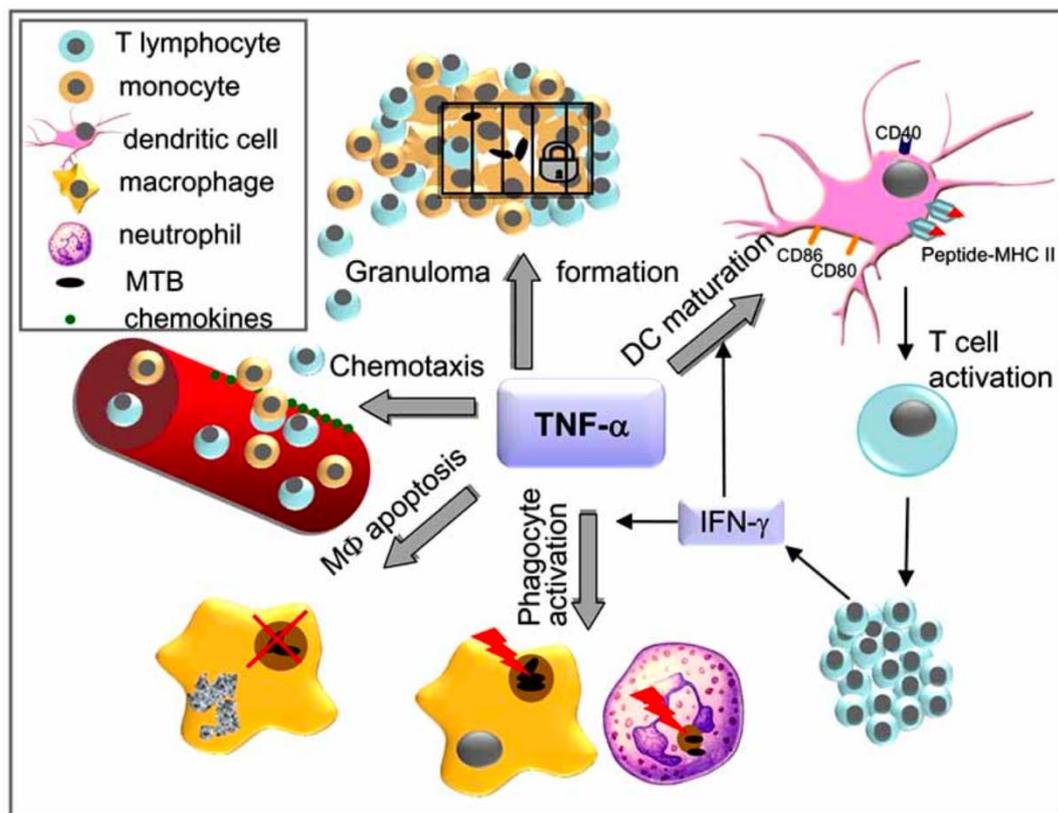
Tumor Necrosis Factor Alpha adalah aktivator kuat dari monosit atau makrofag, yang sinergi dengan IFN- γ untuk menginduksi aktivitas antimikroba melalui induksi oksigen dan nitrogen reaktif perantara (ROI dan RNI). RNI diyakini sangat penting untuk membunuh *Mycobacterium tuberculosis* intraseluler, meskipun masih ada beberapa kontroversi apakah berperan pada manusia. Di sisi lain, TGF memamerkan kekebalan aktivitas supresif. Karena itu, respon imun terhadap infeksi mikobakteri melibatkan sejumlah besar sitokin, yang menunjukkan banyak efek seluler, dan

kesemuanya aktivitas sitokin saling mempengaruhi yang akhirnya mengakhiri infeksi (Mootoo *et al.*, 2009).

Kekebalan perlindungan tergantung pada kapasitas tubuh menghasilkan sitokin sel T spesifik yang meningkatkan produksi sel T antigen reaktif *Mycobacterium tuberculosis* dan menginduksi makrofag melalui aktivasi melalui IFN- γ dan TNF α , menghasilkan pembentukan granuloma. Namun, pembentukan granuloma tidak terjadi sebagai respons langsung terhadap patogen *Mycobacterium tuberculosis*. Bisa membutuhkan waktu hingga 3 minggu untuk jumlah sel yang cukup untuk direkrut mengandung pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*. Selama waktu itu, bacilli terus menyerang dan mereplikasi dengan cepat di dalam makrofag. Oleh karena itu, sistem kekebalan tubuh bawaan terus berlanjut. Untuk merangsang rekrutmen dan aktivasi makrofag yang menghasilkan beberapa faktor autokrin, di antaranya TNF- α adalah yang paling penting. *Tumor Necrosis Factor Alpha* adalah pusat dari suatu mempertahankan respon imun protektif terhadap *Mycobacterium tuberculosis* (Mootoo *et al.*, 2009).

Kematian sel makrofag merupakan kejadian penting pada imunopatogenesis tuberkulosis, karena tidak hanya ikut serta pada bakterisidal langsung pada proses respons imun innate tetapi juga memfasilitasi aktivitas respons imun adaptif. *Tumor Necrosis Factor Alpha* mempunyai kapasitas dominan untuk mempertahankan status dorman 44 infeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada manusia dan juga menunjukkan

aktivitas antimikobakteri yang efektif pada sel mononuklear fagositik. Peran sitokin TNF- α meliputi induksi apoptosis, maturasi dendritic cell (DC) dan induksi respons sel T spesifik serta mengarahkan pergerakan leukosit. Penelitian terhadap hewan coba dan observasi klinis pada pasien autoimun yang mendapat terapi antagonis TNF- α menunjukkan bahwa pasien tersebut akan menderita tuberkulosis. Hal ini mengindikasikan bahwa TNF- α merupakan bagian penting dari respons imun protektif terhadap *Mycobacterium tuberculosis* (Mootoo *et al.*, 2009).



Gambar 2.15. Peran TNF- α dalam Respon Imun Melawan *Mycobacterium tuberculosis* (Mootoo *et al.*, 2009)

Kematian sel makrofag merupakan kejadian penting pada imunopatogenesis TB, karena tidak hanya ikut serta pada bakterisidal

langsung pada proses respons imun innate tetapi juga memfasilitasi aktivitas respons imun adaptif. Tumor Necrosis Factor Alpha mempunyai kapasitas dominan untuk mempertahankan status dorman infeksi *M. tuberculosis* pada manusia dan juga menunjukkan aktivitas antimikobakteri yang efektif pada sel mononuklear fagositik. Peran sitokin TNF- α meliputi induksi apoptosis, maturasi dendritic cell (DC) dan induksi respons sel T spesifik serta mengarahkan pergerakan leukosit. Penelitian terhadap hewan coba dan observasi klinis pada pasien autoimun yang mendapat terapi antagonis TNF- α menunjukkan bahwa pasien tersebut akan menderita tuberkulosis. Hal ini mengindikasikan bahwa TNF- α merupakan bagian penting dari respons imun protektif terhadap *M. tuberculosis* (Lestari, 2021).

J. IFN- γ pada Tuberkulosis

1. Definisi Interferon-gamma (IFN- γ)

Interferon (IFN- γ) merupakan jenis protein yang tergabung ke dalam keluarga besar sitokin. Interferon dibagi ke dalam 2 jenis berdasarkan struktur, fungsi, dan stimulus yang merangsang ekspresi protein ini, yaitu: (i) IFN tipe I yang muncul saat merespon adanya infeksi virus, terbagi ke dalam beberapa kelas yaitu IFN ($-\alpha$, $-\beta$, $-\epsilon$, $-\kappa$, $-\omega$, $-\delta$, $-\tau$). (ii) IFN tipe II, yang disebut juga dengan IFN- γ , yang disekresikan oleh sel-sel yang telah mendapatkan rangsangan dari berbagai stimulus inflamasi maupun reaksi imun lainnya. Interferon- γ merupakan produk dari gen

tunggal yang berasal kromosom 12 (pada manusia) dan kromosom 10 (pada mencit). IFN- γ manusia merupakan suatu glycosylated protein dengan panjang 143 asam amino dan memiliki sedikit sequence homology dengan kelas IFN- α dan IFN- β . Meskipun IFN- γ memiliki sejumlah aktifitas biologis yang sama dengan IFN tipe I, namun IFN- γ juga memperlihatkan adanya berbagai aktifitas lain, hal ini menunjukkan bahwa peran alami yang dimainkan oleh IFN γ adalah sebagai modulator sistem imun (Wahyuniati, 2018).

Sitokin utama yang diproduksi oleh sel T pada infeksi TB dan telah banyak digunakan untuk mendignosis tuberkulosis adalah *Interferon gamma* (IFN- γ) (Prihantika *et.al.*, 2019), Sel T helper (Th1) dapat berperan pada sistem pertahanan tubuh terutama dalam menghadapi infeksi bakteri intraseluler. Interferon gamma yang merupakan sitokin dari sel Th1 penting dalam upaya untuk mengeliminasi *Mycobacterium tuberculosis* (Takdir *et.al.*, 2018).

2. Biosintesis Interferon Gamma (IFN- γ)

IFN- γ terutama dihasilkan secara endogen oleh sel limfosit T (CD4+ dan CD8+) dan sel Natural Killer (NK) yang telah teraktivasi akibat adanya respon terhadap stimulus antigen spesifik. IFN- γ merupakan sitokin yang menjadi tanda khas subset TH1. IFN- γ merupakan sitokin utama yang berperan dalam aktivasi makrofag dan memiliki fungsi yang sangat penting dalam cell mediated immunity terhadap mikroba intraseluler. Terdapat 2 jalur mekanisme produksi IFN- γ yang telah ditemukan dengan

menggunakan sel T CD4⁺ , yaitu: (i) T cell receptor (TCR) mediated antigen-dependent pathway, cyclosporinesensitive, dan (ii) cytokine-induced, cyclosporine-insensitive pathway. Secara eksperimental, produksi IFN- γ juga dapat diinduksi dengan menggunakan stimulus yang menyerupai aktivasi via TCR, yaitu meliputi penggunaan mitogen (seperti concanavalin A atau phytohemagglutinin), cross-linking antibodies, atau agen-agen farmakologis (seperti kombinasi phorbol myristate acetate dan calcium ionophore). Pada sel T yang tidak teraktivasi (resting), gen IFN- γ tidak diekspresikan sehingga proteinnya tidak dapat dideteksi. Namun, setelah terjadi aktivasi sel T, IFN- γ dapat dideteksi dalam rentang waktu 6 – 8 jam, kadarnya akan mencapai level maksimum pada 12 – 24 jam, dan kemudian setelah itu akan kembali menurun hingga ke nilai baseline. Sel TH1 dan sel CD8⁺ yang telah mengalami diferensiasi sebelumnya juga akan mensekresikan kadar IFN- γ yang kuat sebagai respon terhadap stimulasi dari kombinasi IL-12 dan IL-18 (disebut juga sebagai IFN- γ -inducing factor, IGIF) tanpa perlu adanya stimulasi melalui TCR. Produksi IFN- γ yang muncul sebagai respon stimulasi sitokin memiliki durasi yang lebih tahan lama daripada yang muncul karena stimulasi TCR. IL-12 dan IL-18 bersinergi menginduksi IFN- γ melalui sebuah mekanisme yang melibatkan faktor transkripsi Stat4 dan NF- κ B. 15IFN- γ telah diketahui dapat menurunkan produksi (downregulate) IL-4 dan IL-10 oleh sel TH2. Namun menariknya, IFN- γ ternyata juga dapat meningkatkan polarisasi TH2 dan sel-sel yang memproduksi IL-4 bila IFN- γ muncul saat awal priming sel T.

IFN- γ juga dapat mengontrol produksi dan aktivasi sel Treg (CD4⁺ /CD25⁺ regulatory T cell). Tregs berfungsi untuk menekan berbagai macam respon imun dan juga menginduksi immune tolerance. Dengan adanya peran tambahan ini disertai dengan peran klasiknya sebagai sitokin pro-inflamasi, menunjukkan bahwa IFN- γ memiliki peran yang luas dalam meregulasi respon imun host (Wahyuniati, 2018).

3. Peran Interferon Gamma pada Infeksi *Mycobacterium tuberculosis*

Sifat khas yang dimiliki oleh bakteri intraseluler fakultatif seperti *Mycobacterium tuberculosis* adalah kemampuannya untuk dapat bertahan hidup bahkan dapat melakukan multiplikasi di dalam sel fagosit. Oleh karena mikroba ini mampu bersembunyi dari antibodi host yang bersirkulasi, maka proses eliminasi mikroba ini membutuhkan mekanisme cell-mediated immunity. Cell-mediated immunity terdiri dari 2 tipe reaksi: (i) sel T CD4⁺ merekrut sel fagosit dan mengaktifasi mereka melalui CD40 ligand dan IFN- γ yang akan membunuh mikroba yang telah difagositosis, (ii) cytotoxic T lymphocytes CD8⁺ membunuh sel host yang telah terinfeksi. IFN- γ akan mengaktifasi sejumlah jalur signaling dan faktor-faktor transkripsi, terutama yang paling penting dalam hal ini adalah STAT1, sedangkan sinyal dari Toll like receptor (TLR) dan CD40 akan mengaktifasifaktor transkripsi NF- κ B dan activation protein 1 (AP1). Faktor-faktor transkripsi ini akan menstimulasi ekspresi sejumlah enzim pada fagolisosom makrofag, meliputi: enzim fagosit oksidase, yang akan menginduksi produksi reactive oxygen species (ROS); inducible nitric oxide

synthase (iNOS), yang menstimulasi produksi nitric oxide (NO); dan enzim-enzim lisosom. Berbagai substansi ini akan menghancurkan mikroba yang telah diingesti di dalam vesikel serta juga bertanggung jawab atas fungsi-fungsi mikrobisidal yang dimainkan oleh makrofag yang telah teraktivasi (Abbas AK, Lichtman AH.,2012)

IFN- γ juga menstimulasi produksi isotypes antibodi (seperti IgG2a pada muncit) yang akan mengaktivasi komplemen dan mengopsonisasi bakteri untuk difagositosis, yang mana hal ini akan membantu fungsi efektor makrofag. Bagaimana mekanisme stimulus produksi antibodi ini pada manusia belum dapat dijelaskan secara pasti. Pentingnya IFN- γ dan IL-12 pada imunitas terhadap bakteri intraseluler telah didemonstrasikan pada berbagai eksperimen hewan coba serta pada kondisi imunodefisiensi kongenital. Sebagai contoh, individu yang mewarisi mutasi pada reseptor IFN- γ atau IL-12 akan sangat rentan terhadap infeksi mikobakteria atypical. Adanya interaksi antara makrofag yang telah terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dan sel limfosit T juga akan menimbulkan pelepasan berbagai mediator seperti IL-1 β , IL-6, IL-10 dan TNF- α . Berbagai sitokin ini memainkan peran regulasi tertentu yang dapat mengontrol atau bahkan dapat meningkatkan pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* di dalam makrofag (Abbas AK, Lichtman AH.,2012).

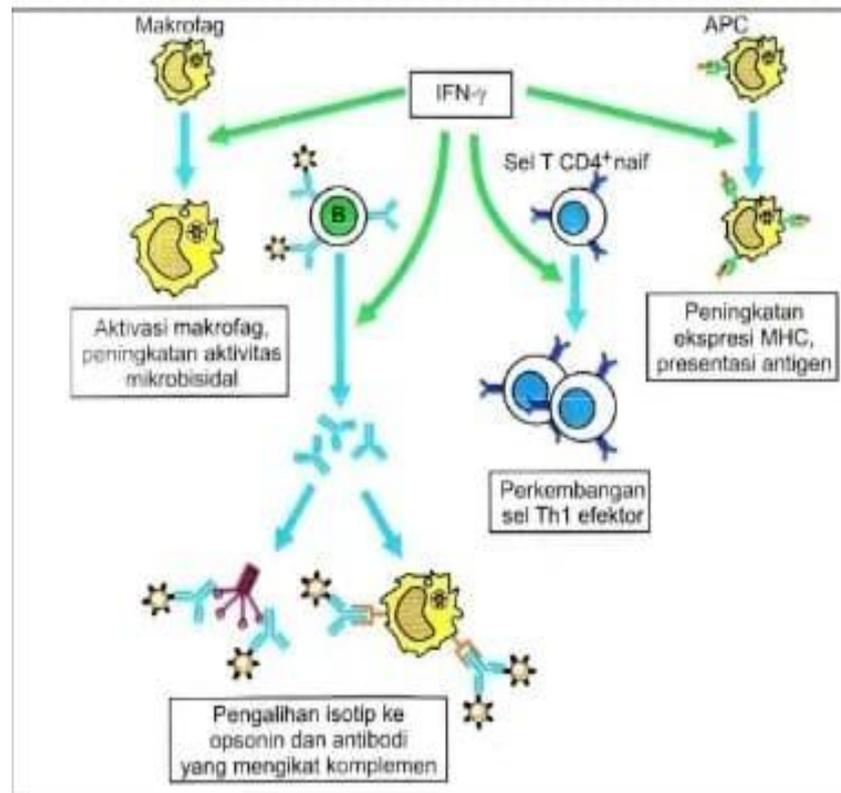
IFN- γ , TNF- α dan IL-18 masing-masing berkontribusi untuk menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*, namun peran masing-masing sitokin ini hanya menyumbangkan sebanyak 1/3 bagian dari

total mekanisme restriksi pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*. Namun, dari hasil penelitian yang telah dilakukan baru-baru ini menunjukkan bahwa secara bersama-sama ketiga sitokin ini telah memperlihatkan suatu mekanisme pengontrolan pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* yang lebih efektif. Pemilihan waktu yang tepat (timing) pada proses signaling IFN- γ dan TNF- α juga mempengaruhi strategi aktivasi makrofag dalam melawan *Mycobacterium tuberculosis*. Perkembangan penelitian akhir-akhir ini menunjukkan hasil bahwa mekanisme autophagy merupakan mekanisme pertahanan innate yang sangat berperan dalam mengeliminasi bakteri-bakteri patogen intraseluler. Adanya induksi autophagy akan mengantarkan mikobakteria ke dalam lisosom yang mana hal ini akan menyebabkan berhasil dibunuhnya bakteri tersebut. IFN- γ telah diketahui dapat menginduksi terjadinya mekanisme autophagy pada sel yang terinfeksi mikobakteria. Induksi autophagy oleh IFN- γ ini berhubungan dengan imunitas protektif terhadap tuberkulosis. Namun, bagaimana mekanisme pasti timbulnya autophagy akibat induksi IFN- γ belum diketahui secara jelas. Sitokin-sitokin TH2 seperti IL-4 dan IL-13 menghambat autophagy akibat induksi IFN- γ , hal ini telah ditunjukkan pada makrofag mencit dan manusia.³¹ IL-6 yang dihasilkan oleh makrofag yang terinfeksi mikobakteria juga secara selektif menghambat respon makrofag terhadap IFN- γ , namun apakah IL-6 turut berperan dalam mekanisme autophagy yang diinduksi IFN- γ belum diketahui dengan pasti (Wahyuniati, 2018)

Interferon gamma juga bertugas untuk memperkuat potensi fagosit dari makrofag yang terinfeksi oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yaitu dengan cara menstimulasi pembentukan radikal bebas untuk menghancurkan komponen bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yaitu DNA dan dinding sel bakteri. Interferon gamma ini juga berperan dalam pembentukan granuloma pasca infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Namun demikian, interferon gamma (IFN- γ) tidak dapat diproduksi untuk mengeliminasi *Mycobacterium tuberculosis*, tetapi juga sebagai respon terhadap bakteri lainnya (Takdir *et.al.*, 2018).

Interferon gamma (IFN- γ) yang diproduksi berbagai sel sistem imun merupakan sitokin utama MAC (*Macrophage Activating Cytokine*) dan berperan terutama dalam imuniti yang tidak spesifik dan spesifik seluler. Interferon gamma (IFN- γ) adalah sitokin yang mengaktifkan makrofag untuk membunuh (fagosit) mikroba. Interferon gamma (IFN- γ) merangsang ekspresi MCH-I dan MCH-II dan kostimulator APC. Interferon gamma (IFN- γ) meningkatkan perbedaan sel CD4⁺ naik ke subset sel Th1 dan mencegah proliferasi sel Th2. Interferon gamma (IFN- γ) bekerja terhadap sel B dalam pengalihan subkelas IgG yang mengikat Fc γ -R pada fagosit dan mengaktifkan komplemen. Kedua proses tersebut meningkatkan fagositosis mikroba yang diopsonisasi. Interferon gamma (IFN- γ) dapat mengalihkan Ig yang berpartisipasi dalam eliminasi mikroba. Interferon gamma (IFN- γ) mengaktifkan neutrofil dan merangsang efek sitolitik sel NK. Interferon gamma (IFN- γ) mengaktifkan fagosit dalam APC dan induksi

pengalihan sel B (isotip antibody yang dapat mengikat komplemen dan Fc-R pada fagosit, yang berbeda dengan isotip yang diinduksi IL-4), menginduksi tidak langsung efek Th1 atas peran peningkatan produksi IL-12 dan ekspresi reseptor (Garna & Rengganis, 2012).



Gambar 2.16. efek biologik IFN- γ (Garna & Rengganis, 2012).

Fungsi utama *Interferon gamma* (IFN- γ) dalam mengatur respon imun adalah (Kresno, 2010):

- a. Sebagai aktivator poten untuk fagosit mononuclear. Interferon gamma (IFN- γ) secara langsung menginduksi sintesis enzim yang berperan pada *respiratory burst*, sehingga makrofag dapat membunuh mikroba yang ditelannya. Interferon gamma (IFN- γ) meningkatkan reseptor

untuk IgG (FcγRI) pada permukaan makrofag sehingga disebut *macrophage activating Factor* (MAC).

- b. Interferon gamma (IFN-γ) meningkatkan ekspresi molekul MCH kelas I, dan juga ekspresi MCH kelas II pada beberapa jenis sel. Dengan demikian, interferon gamma (IFN-γ) berperan penting pada fase pengenalan respon imun.
- c. Interferon gamma (IFN-γ) merangsang sel T untuk berdiferensiasi dan merangsang sel B untuk meningkatkan *class switching* untuk menghasilkan IgG2a dan IgG3, tetapi menghambat *class Switching* yang menghasilkan IgG1 dan IgE.
- d. Interferon gamma (IFN-γ) juga mengaktivasi neutrofil dan meningkatkan *respiratory burst*
- e. Interferon gamma (IFN-γ) merangsang aktivitas sitolitik sel NK.
- f. Interferon gamma (IFN-γ) juga merupakan aktivator sel endotel, meningkatkan adhesi sel T CD4⁺ dan perubahan morfologik yang memudahkan ekstravasasi limfosit. Dampak akhir dari semua aktivitas di atas adalah meningkatkan reaksi inflamasi yang penuh dengan makrofag dan menghambat reaksi eosinofil yang bergantung pada IgE.

K. Relevansi Penelitian Sebelumnya

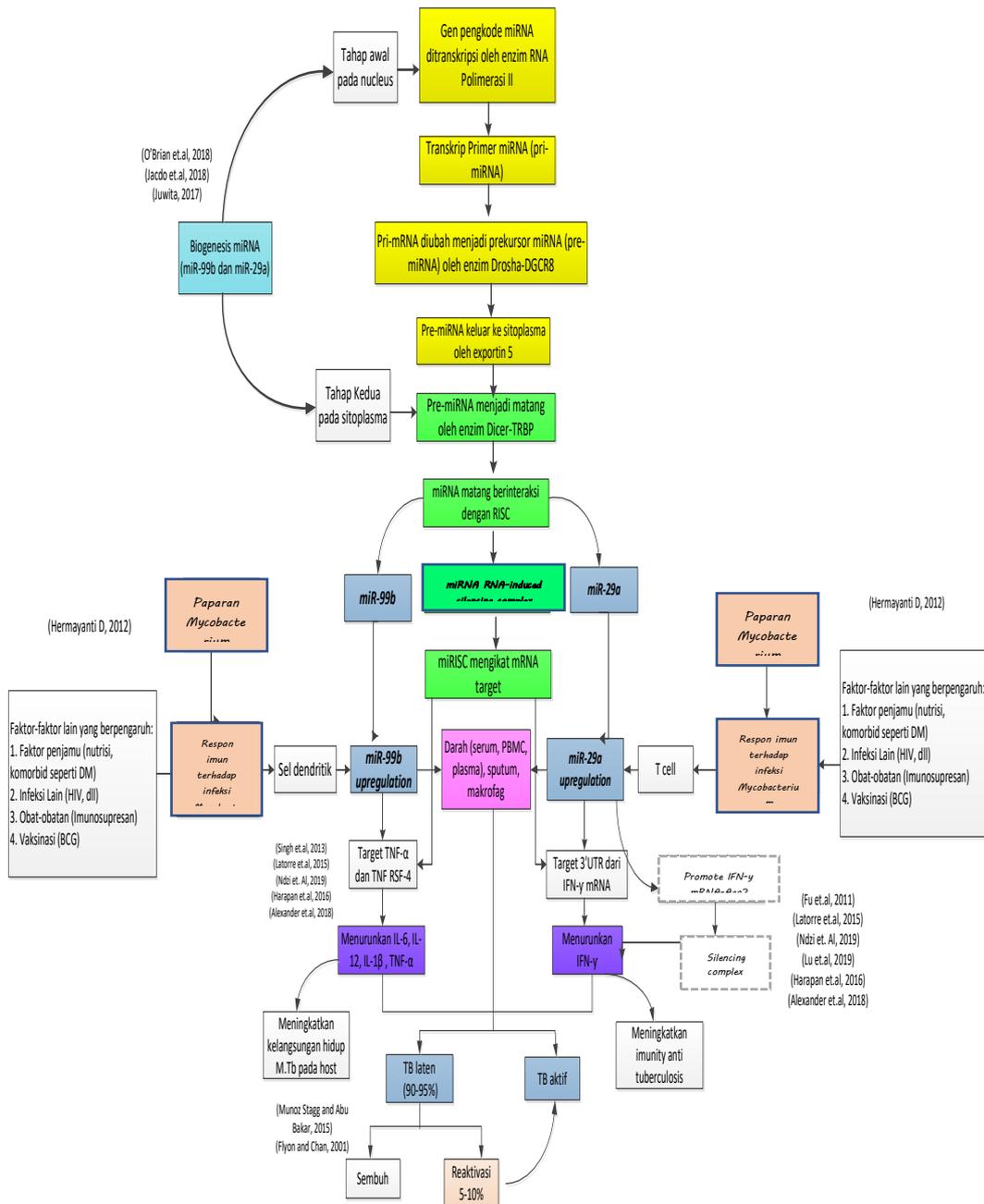
Tabel 2.3 Relevansi Penelitian miR-99b-5p dan miR-29a-3p Sebelumnya

NO	Kategori Kasus	Lokasi Penelitian	Sampel	HASIL PENELITIAN	REFERENCE
1	84 ATB, 35 LTBI, 42 HC	Cameroon	Plasma	miR-29a-3p, secara signifikan diregulasi di ATB dibandingkan dengan HEC (p : 0,05). MiR-29a-3p menunjukkan diagnostik yang baik (81,37%) dalam membedakan ATB dari HEC dan diagnostik yang baik (84,35%) dalam membedakan ATB dari LTB. miR-29a-3p yang ada dalam darah mampu membedakan TB aktif dari TB laten dan kontrol sehat serta menunjukkan bahwa ini mungkin merupakan biomarker yang berguna untuk diagnosis TB. Karena miRNA ini ditemukan dalam darah (plasma) yang mudah dikumpulkan dibandingkan dengan dahak, sehingga miRNA ini dapat digunakan pada kasus TB pediatrik dan ekstra paru.	(Ndzi <i>et al.</i> , 2019)
2	100 ATB, 100 HC	China	Plasma	miR-99b-5p upregulated in TB dan down regulated pada pasien TB dengan pengobatan	(Barry <i>et al.</i> , 2018)
3	34 ATB, 17 TB-HIV	South Africa	Plasma	miR-29a-3p down regulated pada TB	(Sinigaglia <i>et al.</i> , 2020)

4	75 ATB 55 HC	China	Serum	Peningkatan ekspresi miR-29a-3p dalam darah pasien TB aktif, yang dapat membedakan pasien TB aktif dari kontrol yang sehat. miR-29a berpotensi besar sebagai penanda deteksi infeksi TB paru aktif	(Fu <i>et al.</i> , 2011)
5	9 TB aktif 10 LTBI 9 HC	Peru	Serum	Tingkat ekspresi miR-29a-3p yang ditemukan dalam penelitian ini tinggi pada sampel TB aktif dan laten dibandingkan dengan kelompok kontrol sehat, tetapi lebih tinggi diekspresikan dalam sampel TB laten daripada sampel TB aktif. Namun, tidak ada perbedaan yang signifikan dalam ekspresi antara TB laten dan TB aktif. Tidak ada perbedaan statistik yang ditemukan pada ekspresi miR-99b antara pasien TB aktif dan TB laten	(Capristano and Guio, 2020)
6	TB aktif = 32 TB laten = 19	Ghana		IFN- γ sangat penting untuk perlindungan terhadap <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . miR-29 baru-baru ini terbukti menghambat IFN- γ secara tidak berlebihan. Di sini, kami menyelidiki dinamika ekspresi IFN- γ dan miR-29a sel T CD4+ dari pasien selama tuberkulosis aktif (TB) (n = 32) dan pada kontak serumah yang terinfeksi <i>M. Tuberkulosis</i> (n = 19) dari Ghana. Sedangkan	(Afum-Adjei Awuah <i>et al.</i> , 2014)

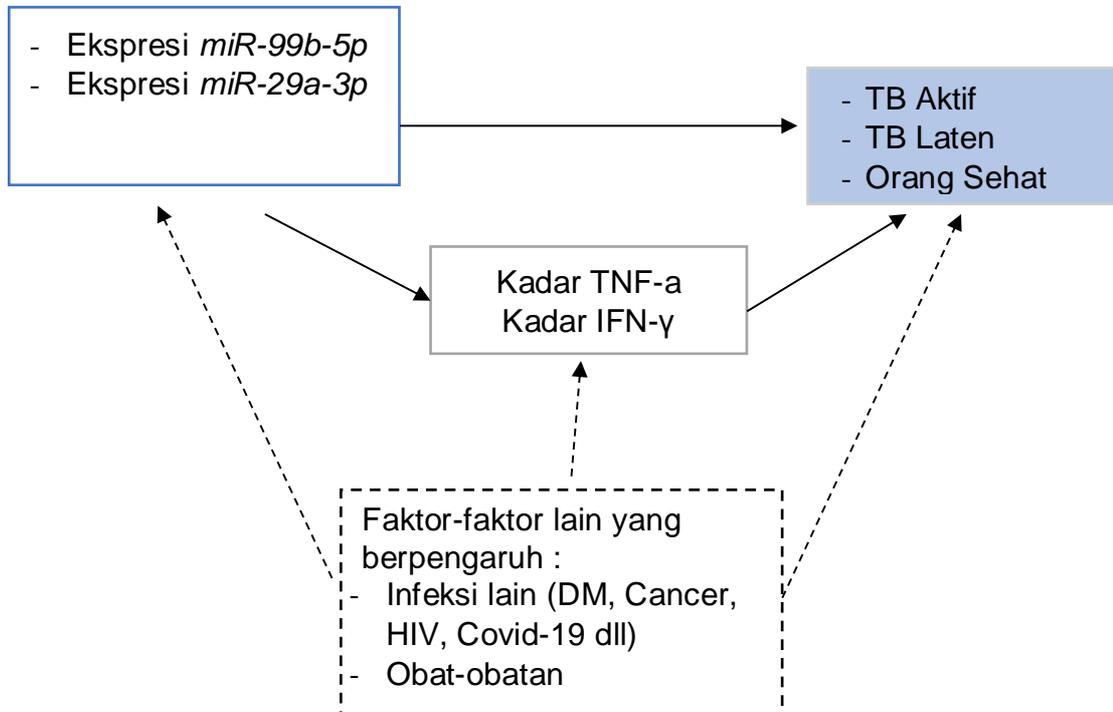
				ekspresi IFN - γ spesifik Mycobacterium tuberculosis serupa selama kemoterapi TB, stimulasi superantigen menunjukkan gangguan ekspresi IFN- γ pada pasien TB secara umum. Tidak ada saling ketergantungan antara miR-29a dan ekspresi IFN- γ pada sel T diamati. Namun, miR-29a diekspresikan secara berbeda dalam sel T selama kemoterapi. Kami menyimpulkan bahwa perbedaan ekspresi miR-29a pada TB aktif tidak menyebabkan gangguan ekspresi IFN- γ	
7	12 ATB 12 HC	South Africa	PBMCs	miR-99b-5p downregulated pada TB aktif	(van Rensburg <i>et al.</i> , 2018)
8	9 ATB 9 HC	Argentina	PBMCs	miR-29-3p downregulated pada TB aktif	(Spinelli <i>et al.</i> , 2017)
9	122 ATB 130 HC	China	PBMCs	miR-29-3p up regulated pada TB aktif	(Pan, Pan and Xu, 2017)
10	28 ATB 24 HC	China	PBMCs	miR-29-3p up regulated pada TB aktif	(Zhou <i>et al.</i> , 2016)
11	22 ATB 14 LTBI	Germany	CD4+T cells	miR-29-3p downregulated pada TB aktif	(Kleinsteuber <i>et al.</i> , 2013)

L. Kerangka Teori



Gambar 2.17 Kerangka Teori

M. Kerangka Konsep



Keterangan :

 : variabel independent

 : variabel perancu

 : variabel dependent

Gambar 2.18 .Kerangka Konsep

N. Hipotesis Penelitian

1. Terdapat perbedaan ekspresi *miR-99b-5p* pada pasien tuberkulosis paru aktif, tuberkulosis (TB) laten dan orang sehat .
2. Terdapat perbedaan ekspresi *miR-29a-3p* pada pasien tuberkulosis paru aktif, tuberkulosis (TB) laten dan orang sehat.

3. *miRNA-99b-3p* dan *miRNA-29a-3p* berpotensi menjadi biomarker infeksi tuberkulosis paru.
4. Terdapat hubungan antara ekspresi *miR-99b-5p* dengan kadar TNF- α pada pasien tuberkulosis paru aktif, tuberkulosis paru laten dan orang sehat.
5. Terdapat hubungan antara ekspresi *miR-29a-3p* dengan kadar IFN- γ pada pasien Tuberkulosis paru aktif, tuberkulosis laten dan orang sehat.